



Les vésicules extracellulaires comme vecteurs de macromolécules bioactives : modèle du transporteur ABCC7 (CFTR) et application à la biothérapie de la mucoviscidose

Cyrielle Vituret

► To cite this version:

Cyrielle Vituret. Les vésicules extracellulaires comme vecteurs de macromolécules bioactives : modèle du transporteur ABCC7 (CFTR) et application à la biothérapie de la mucoviscidose. Santé. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10330 . tel-01328179

HAL Id: tel-01328179

<https://theses.hal.science/tel-01328179>

Submitted on 7 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Melle Cyrielle VITURET

**Les vésicules extracellulaires comme vecteurs de macromolécules bioactives :
modèle du transporteur ABCC7 (CFTR)
et application à la biothérapie de la mucoviscidose**

Thèse co-dirigée par Mme la Dr Saw-See HONG et M le Dr Attilio DI PIETRO

soutenue publiquement le 18 décembre 2015

JURY :

M le Pr Gabriel BELLON	Président
M le Dr Michel CHIGNARD	Rapporteur
M le Pr Tristan MONTIER	Rapporteur
M le Pr Jean-Christophe PAGÈS	Rapporteur
M le Dr Pascal FENDER	Examineur
Mme la Dr Saw-See HONG	Directrice de thèse
M le Dr Attilio DI PIETRO	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais commencer par remercier la région Rhône-Alpes pour le financement de ma thèse et l'attribution d'une bourse Explora'Doc, ainsi que l'association Vaincre La Mucoviscidose pour le financement de la prolongation de mon contrat doctoral.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de juger ce travail, le Pr Gabriel Bellon pour avoir accepté de présider le jury, mes rapporteurs le Dr Michel Chignard, le Pr Tristan Montier et le Pr Jean-Christophe Pagès, ainsi que mon examinateur le Dr Pascal Fender. Mes remerciements vont également aux membres de mon comité de suivi de thèse, les Dr Patrice Bouvagnet et Pascal Fender, pour le regard extérieur qu'ils m'ont apporté.

Je remercie les Pr Jean-François Mornex, Christophe Terzian et Gilbert Deléage pour m'avoir accueillie au sein des UMR 754 et 5086, ainsi que les Dr Corinne Ronfort et Attilio Di Pietro au sein des équipes RI2V et 2MRM.

Mes remerciements vont tout naturellement aux Dr Saw-See Hong et Attilio Di Pietro, ainsi qu'au Pr Pierre Boulanger et pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et préparée à le défendre lors du concours, mais aussi pour m'avoir fait confiance tout au long de ces quatre années et avoir répondu à mes nombreuses interrogations avec beaucoup de patience et de bienveillance. Je vous remercie également pour m'avoir permis de participer à différents congrès, tous plus intéressants les uns que les autres, y compris celui où j'ai eu l'occasion de rencontrer le célèbre J. Riordan ! Enfin je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait participer à de nombreux projets de recherche qui ont permis de nourrir ma curiosité scientifique.

Je tiens à remercier Sylvie Farget, Dorothée Bernard et Emilie Zitte pour leur aide administrative et de gestion, Monique Martingay alias Momo, pour le soin qu'elle mettait à tenir le laboratoire propre et rangé, ainsi que pour sa formation « laverie » lors de son départ, sans oublier Georges et Serge de l'accueil pour leur sympathie.

Je remercie bien sûr Gaëlle Gonzalez pour m'avoir passé la main et aussi pour m'avoir rassurée sur le fait que la thèse... c'est facile !

Je remercie avec beaucoup d'affection mes acolytes Kathy et Marie-Pierre alias MPi, pour votre aide technique en fin de course ! Kathy, tu es mon âme sœur du perfectionnisme, merci pour les clés que tu m'as données, tu m'as énormément appris tant sur plan professionnel que personnel, merci pour toutes ces astuces partagées, ainsi que pour l'oreille attentive et compréhensive que tu as su me prêter. MPi, ma binôme de laverie, merci pour ta bonne humeur quotidienne et ta gentillesse, tu as toujours le mot pour prendre les choses du bon côté et rire de toute sorte de situations !

Najate, ma petite Poca Poca ! Merci pour tes petits mots, que j'ai toujours eu plaisir à trouver sur mon bureau le soir au retour d'une manip. Une pensée particulière pour le célèbre « LOL » et au « coucou miss » d'un bout à l'autre de l'immense couloir, en blouse ou non, à n'importe quelle heure du jour ou de la nuit, de quoi redonner le sourire et laisser l'espace d'un instant les tracas quotidiens. N'oublie pas : tu fais du bon boulot, rendez-vous dans les îles Panok ;-)

Merci également à Franck, 3^{ème} thésard de l'année 2011, toujours prêt à donner des conseils et à écouter, Barbara alias Bab, ma photographe officielle pour la course des héros, toujours prête à aider et pour qui j'aurai toujours une pensée pour son rituel quotidien :-), Céline, ma fidèle voisine qui aime voir les choses du bon côté : regarde le ciel est « presque » bleu ;-)

éphémères, Halima, Nicolas et Yohan, merci pour nos échanges aussi bien d'un point de vue manip que communication et anecdotes diverses ! Merci également aux étudiants de passage, dont certains sont maintenant en thèse ^^ Wil, View, Goy, Emma, Maryline, Margaux, Margot, Pierre, Nader, Julien, Lucie, Sarah, Takouhie, Stéphanie, Fabrice J'ai été ravie de faire votre connaissance et ce fut chaque fois un plaisir d'échanger avec vous ! Merci également à Claire pour son soutien et je n'oublierai pas l'histoire de l'arbre et de la forêt ! Ainsi qu'à Lucas mon stagiaire pour m'avoir donné l'opportunité de m'essayer au rôle d'encadrante.

Je remercie également Catherine, Christine et Caroline, pour le partage de leurs compétences en métrologie, en qualité, et en informatique, Carine pour ses conseils en qPCR, Fabienne pour nos échanges sur les exosomes, Barbara V pour son aide de dernière minute, Michelle alias Mimi pour ses paroles réconfortantes, François pour son soutien les soirs et les jours fériés, et Alex pour son écoute et sa gentillesse.

Je remercie enfin tous les membres de l'UMR754 pour leur accueil et chacun d'entre vous pour nos échanges tout au long de ces 4 années. Merci également aux membres de l'UMR5086 et notamment Charlotte, Lauriane, Lorena, Elodie, Mylène, et Hélène pour nos congrès partagés.

Je souhaite remercier le Pr Marc Chanson qui m'a accueillie en stage Explora'Doc de 6 mois au cours de ma 2^{ème} année de thèse, et que j'admire beaucoup. J'ai apprécié ton franc-parler et le cadre que tu m'as donné. Je remercie également les membres de son équipe que j'ai eu la chance de rencontrer, Marc Bacchetta, « et puis tant mieuux si ça marche pas !! », Davide qui est maintenant à l'autre bout de la Terre en Australie, Joanna, « où il est ton papa ? » et les tartines de Nutella-miel pour bien recharger les batteries !! Richard, le post-doc au grand cœur, toujours prêt à discuter manips et à donner un coup de main les vendredis soirs. Je remercie également Assunta, Lan et Christine qui partageaient avec beaucoup de gentillesse le premier étage de la tulipe avec nous.

Je tiens à remercier les différents personnels techniques que j'ai pu côtoyer tout au long de ma thèse, Thibault Andrieu, Sébastien Dussurgey et Jean-Pierre Aubry pour la cytométrie en flux à Lyon ou à Genève, Bariza Blanquier pour la qPCR, ou encore Nathalie Calin pour le DLS. Merci pour vos conseils avisés et vos formations très enrichissantes. Merci également à Ionut pour le temps consacré à la réalisation des clichés de microscopie électronique. Je remercie également Catherine Ott et Laurence Générénaz pour m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire Biomérieux et formée sur le Nanosight. Merci pour votre confiance et nos échanges.

Je remercie Agnès Delebassée-Nabet et Nancy Eps-Willkomm de l'équipe Ludoviro pour m'avoir fait découvrir l'animation scientifique auprès de lycéens, c'est une expérience que j'ai beaucoup appréciée ! Merci à Jules, Pascal et Alexandre pour notre projet « Epidémie sur la RN7 ». Porter les couleurs de Ludoviro du 10 km de la course RunInLyon pour la promotion du jeu était également un honneur ! Merci également à Baptiste que j'ai eu l'occasion de rencontrer lors des journées scientifiques organisées par la région.

Je souhaite remercier à nouveau l'association Vaincre La Mucoviscidose, pour l'organisation des congrès jeunes chercheurs, qui permettent d'appréhender les différents aspects de la recherche autour de cette maladie, aussi nombreux qu'intéressants.

Je remercie les membres de l'association Biodocs-Lyon, et plus particulièrement Laura, Nelcy, Gweltaz, Eloïse, Nathalie M et Nathalie F, Solène, Lauriane, Cvetanka, Chloé, Patrick, Vincent, Anne-Laure, Morgane, Natacha, et Maëlen pour nos nombreux échanges dans nos moments de doutes comme de joie ! Cette association m'a permis de développer des compétences transversales, en tant que webmaster adjointe, mais aussi lors de l'organisation d'événements comme les ateliers emplois. J'ai

également pu faire partie des « volunteers » lors du forum Biovision et voir l'envers du décor ! Parce qu'il y a une vie après la thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité de découvrir tous ces métiers... !

Durant ces 4 années de thèse, j'ai également eu la chance de participer à la course des héros au profit de l'association Vaincre La Mucoviscidose. Je remercie Sabine Dubernard pour m'avoir donné ce défi, ainsi que toutes les personnes qui l'ont relevé à mes côtés, sans oublier tous nos donateurs pour leur soutien, nous permettant de collecter plus de 42 000 € en 3 ans.

Je remercie mon équipe soignante et notamment Raphaëlle Nove-Josserand, Isabelle Durieu, Isabelle Duperray, Frédérique Moinerie, et Nathalie Matray, pour m'avoir apporté une oreille attentive et m'avoir fait confiance lors des moments de « rush ». Ainsi que Thibault Crouteix et Nathalie Zemerli pour m'avoir ouvert patiemment le local de l'infirmerie chaque jour, ce qui m'a grandement facilité la vie ! Merci à ma kiné Céline qui me suit depuis près de 15 ans, j'apprécie beaucoup ton franc-parler et les coups de pied aux fesses que tu sais donner avec beaucoup de bienveillance. Merci également pour m'avoir entraînée dans l'étude transversale du respect du protocole Tobi® Podhaler®, qui a été une expérience très intéressante. Je souhaite également remercier Sylvie Koprowiak pour son écoute et ses techniques de relaxation, ainsi que Danielle du Fitness Park pour sa bonne humeur et son dynamisme communicatifs.

Je remercie mes amis, les déjantés, les têtes de Lyon, et les bioch, pour m'avoir offert une vie à côté de la thèse !! Les verres, les soirées, les pique-niques au bord du Rhône et les week-ends en Ardèche ou à la montagne ont été pour moi une véritable bulle d'oxygène tout au long de ce périple, sans oublier les soirées salsa/bachata ! Je remercie également Cécile ma petite sœur de cœur pour sa présence et son dynamisme. Rendez-vous en Equateur pour de nouvelles aventures ;-), Céline pour son écoute douce et bienveillante, Camille pour nos débats sur la vie ! Merci à Jeff et Romain pour votre présence et votre écoute qui m'ont permis de me reconstruire. Je remercie également Pierre T, sans qui je ne me serais sans doute jamais lancée dans cette aventure ! Ainsi que Chantal, Philippe, Bastien, Odile, Gilles, Constance et Marie-Paule pour m'avoir accueillie durant les 6 dernières années.

Je remercie bien sûr tous les membres de ma famille pour leur écoute et leur soutien, ainsi que pour leurs encouragements, merci d'avoir cru en moi. Un merci tout particulier à Christine et Thierry pour leur accueil bienveillant dans leur contrée toulousaine. Cette retraite m'a été d'une aide précieuse tant scientifique que personnelle. Christine merci pour ton écoute et ta patience ! Ton suivi quotidien m'a permis de tenir lors de la dernière ligne droite !! Merci à mon frère Florian et sa compagne Sophie, pour m'avoir offert le rôle de marraine de la petite Cloé, et à Caroline et Cédric pour celui de la petite Jade. Ce sont des cadeaux qui me vont droit au cœur.

Je remercie mes parents pour leur soutien inconditionnel, leur écoute et leur accompagnement tout au long de cette thèse, ainsi que leur accueil lors de la dernière ligne droite de ma rédaction. Un immense merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, si j'en suis là aujourd'hui c'est en très grande partie grâce à vous. M'élever comme une enfant « normale » m'a permis d'être une adulte « normale » et je vous en suis infiniment reconnaissante.

J'aimerais dédier cette thèse à mes proches, amis et famille, pour leur soutien et leur amour, avec une tendre pensée pour Maria, Jeannette, Alexis, Gustave, Délia et Chantal partis trop tôt mais qui seront toujours présents dans nos cœurs.

Pour finir, cette thèse est l'aboutissement de 4 années d'apprentissage tant scientifique que personnel. Elle a été extrêmement riche en rencontres et je n'en ressors qu'infiniment grandie.

Merci à tous.

« La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber, mais de se relever à chaque fois. »

Nelson Mandela

Table des matières

Remerciements	5
Liste des figures	15
Liste des tableaux	18
Liste des abréviations et acronymes	19
I. INTRODUCTION	25
A. Rappels bibliographiques	27
1 Les transporteurs ABC	29
1.1 Introduction générale	31
1.2 Structure des transporteurs ABC	31
1.2.1 Les NBD	32
1.2.2 Les TMD	33
1.2.3 Classification des transporteurs ABC	33
1.3 Mécanisme des transporteurs ABC	33
1.4 Fonctions et rôles physiologiques des transporteurs ABC	35
1.5 Maladies associées aux transporteurs ABC	36
1.5.1 La surexpression de transporteurs ABC entraîne une résistance aux traitements	36
1.5.2 La sous-expression des transporteurs ABC à l'origine de maladies graves	37
2 La mucoviscidose	39
2.1 Introduction générale	41
2.2 Historique	41
2.3 La mucoviscidose, une origine génétique	42
2.3.1 Le gène <i>CFTR</i>	42
2.3.2 La protéine CFTR	43
2.4 La mucoviscidose, une maladie génétique	48
2.4.1 Introduction	48
2.4.2 Les différentes classes de mutations du gène <i>CFTR</i>	48
2.4.3 La mutation $\Delta F508$	50
2.4.4 Transmission de la maladie	51
2.4.5 Génotypes responsables de la mucoviscidose	53
2.4.6 Phénotypes caractéristiques de la mucoviscidose	53
2.5 Les traitements de la mucoviscidose	56
2.5.1 La « pipeline »	56

2.5.2	Les traitements actuels	57
2.5.3	Les traitements en cours de recherche	58
3	Les vésicules extracellulaires	67
3.1	Découverte des vésicules extracellulaires.....	69
3.2	Biogenèse des EV.....	70
3.2.1	Les différentes catégories d'EV	70
3.2.2	Voies de synthèse des EV	70
3.2.3	Composition lipidique, protéique et nucléique des EV	75
3.3	Mécanismes de communication	76
3.4	Fonctions des EV.....	78
3.4.1	Un nouvel outil de communication intercellulaire.....	78
3.4.2	Régulation de la réponse immunitaire et présentation d'antigènes	80
3.4.3	Communication neuronale.....	80
3.4.4	Prolifération et différenciation cellulaire	81
3.5	Applications des EV	82
B.	Contexte scientifique et objectifs de la thèse.....	85
II.	MATERIEL ET METHODES.....	91
1.	Techniques de biologie cellulaire	93
1.1.	Culture cellulaire	93
1.1.1.	Conditions de culture	93
1.1.2.	Lignées cellulaires utilisées dans cette étude	93
1.2.	Transfection.....	94
1.2.1.	Principe.....	94
1.2.2.	Transfection des CHO-K1 et des 16HBE par le plasmide pCEP4-EGFP-CFTR.....	95
1.2.3.	Transfection des A549 et des HEK-293 par le plasmide pEGFP-CFTR	95
1.3.	Transduction.....	95
1.3.1.	Vecteurs adénoviraux Ad5-GFP et Ad5-GFP-CFTR	95
1.3.2.	Protocole	96
1.4.	Test de cytotoxicité : MTT	96
2.	Techniques de biologie moléculaire.....	96
2.1.	Clonage.....	96
2.1.1.	Principe.....	96
2.1.2.	Clonage de la séquence codant la protéine de fusion GFP-CFTR dans le plasmide pCEP4	97
2.1.3.	Clonage de la séquence codant la protéine de fusion GFP-CFTR dans le plasmide pLXRN	100

2.2.	Extraction et dosage des protéines	102
2.3.	Détection de protéines par western blot	102
2.4.	Extraction et dosage d'ARN	105
2.5.	Détection d'ARNm par RT-PCR et quantification par qRT-PCR	105
3.	Production et purification des EV	107
3.1.	Sans stimulation	107
3.2.	Avec stimulation par l'ionophore du calcium A23187	108
4.	Caractérisation des EV	108
4.1.	Détermination de la taille des EV par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	108
4.2.	Estimation de la concentration des EV à l'aide du NanoSight®	110
5.	Etude du mécanisme de transfert	111
5.1.	Inhibiteurs métaboliques	111
5.2.	Effet de la température	111
6.	Transfert de CFTR d'un type cellulaire à un autre : cas des neutrophiles.....	112
7.	Cytométrie en flux	112
8.	Tests de fonctionnalité du CFTR	114
8.1.	Sonde DiSBAC ₂ (3)	114
8.2.	Microvoltmétrie	115
9.	Techniques de microscopie	116
9.1.	Microscopie confocale	116
9.2.	Image Stream X	118
9.3.	Microscopie électronique.....	118
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	121
	Partie I Preuve de concept en cellules de hamster	123
	Partie II Validation du modèle en cellules humaines	131
1.	Cellules donneuses d'EV	133
1.1.	Les Calu-3.....	133
1.2.	Transfection par le plasmide épisomal pCEP4-EGFP-CFTR.....	134
1.3.	Transduction par le vecteur adénoviral Ad5-GFP-CFTR	136
1.4.	Transduction par le vecteur adénoviral Ad5-GFP	137
2.	Caractérisation des EV	138
2.1.	Microscopie électronique à transmission	138
2.2.	Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	138
2.3.	Western blot anti-Tsg101 et anti-CD63.....	138
2.4.	Cytométrie en flux.....	139
2.5.	Semi-quantification des EV.....	140

2.6.	Contenu des EV en matériel biologique d'intérêt.....	141
2.6.1.	Contenu des EV en ARNm	141
2.6.2.	Contenu des EV en protéines	142
2.7.	Cytotoxicité des EV.....	143
2.8.	Optimisation de la production des MV : ionophore du calcium	144
3.	Cellules cibles des EV	145
3.1.	Etude de transfert et de fonctionnalité.....	145
3.1.1.	Cellules cibles des EV produites par les Calu-3	145
3.1.2.	Cellules cibles des EV produites par les A549-Ad5-GFP-CFTR.....	146
3.2.	Etude du mécanisme de transfert.....	149
3.2.1.	Cinétique	149
3.2.2.	Inhibiteurs métaboliques	150
3.2.3.	Effet de la température	152
3.2.4.	Imagerie par microscopie électronique à transmission	152
3.2.5.	Imagerie par microscopie confocale	153
3.3.	Etude de l'effet de la bafilomycine A1	154
3.4.	Transfert d'un type cellulaire à un autre.....	156
IV.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	159
V.	PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	167
VI.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	177

Liste des figures

Figure 1. Schéma d'une membrane biologique	31
Figure 2. Schéma de la structure d'un transporteur ABC	32
Figure 3. Les motifs caractéristiques des transporteurs ABC.....	32
Figure 4. Schéma du mécanisme d'export des transporteurs ABC selon le modèle « ATP switch »	34
Figure 5. Structures cristallographiques de transporteurs ABC.....	34
Figure 6. Le gène CFTR donne naissance à la protéine CFTR	42
Figure 7. Structure de la protéine CFTR	43
Figure 8. Mécanisme d'ouverture du canal CFTR.....	44
Figure 9. Synthèse de la protéine CFTR.....	46
Figure 10. La protéine CFTR contribue à la clairance mucociliaire	46
Figure 11. Schéma de la régulation du canal ENaC par CFTR.....	47
Figure 12. Répartition des différents types de mutation sur le gène CFTR	48
Figure 13. Les 6 classes de mutation du gène CFTR.....	49
Figure 14. Images de microscopie confocale représentant des cellules épithéliales ciliées	50
Figure 15. Transmission de la mucoviscidose, maladie autosomique récessive.....	51
Figure 16. Algorithme du dépistage de la mucoviscidose.....	52
Figure 17. Les différents organes atteints chez les patients mucoviscidosiques	54
Figure 18. Schéma général du tractus respiratoire	55
Figure 19. Epithelia glandulaire et de surface	55
Figure 20. Conséquences phénotypiques de la mucoviscidose au niveau respiratoire.....	56
Figure 21. Extrait de la « pipeline » créée par la CFF (octobre 2015)	57
Figure 22. Les recherches sont pluridisciplinaires et axées sur l'origine et les conséquences phénotypiques de la mucoviscidose	58
Figure 23. Action du Meveol sur les biofilms	59
Figure 24. Les différents types de vecteurs utilisables en thérapie génique	62
Figure 25. Représentation et schéma d'un adénovirus	62
Figure 26. Du vecteur adénoviral à l'expression du transgène	63
Figure 27. Image de microscopie électronique des liposomes GL67A.....	64
Figure 28. Découverte de l'exocytose des « endosomes multivésiculaires »	69
Figure 29. Ordre de grandeur des vésicules extracellulaires	70
Figure 30. Voies de synthèse des vésicules extracellulaires	71
Figure 31. Les translocases maintiennent la stabilité de la membrane plasmique au repos	71
Figure 32. Formation des MV	72
Figure 33. La machinerie ESCRT à l'origine des ILV	73
Figure 34. Les EV peuvent être produites via différents stimuli	74
Figure 35. Composition générale des vésicules extracellulaires	75
Figure 36. Les différents modes d'action des EV.....	77
Figure 37. Mécanismes d'internalisation cellulaire des EV	78
Figure 38. Transfert d'ARN et de protéine par l'intermédiaire des vésicules extracellulaires	79
Figure 39. Relation structure / fonctions des EV.....	79
Figure 40. Les exosomes présentateurs d'antigènes	80
Figure 41. Les vésicules extracellulaires, médiateurs dans la progression du cancer	82
Figure 42. Clichés de microscopie confocale de CF-KM4 infectées par Ad5-GFP-CFTRwt ou Ad5-GFP- CFTRdeltF508.....	87
Figure 43. Test de permissivité aux vecteurs adénoviraux Ad5-GFP et Ad5F35-GFP de cellules CHO préalablement traitées respectivement par les MP ₃₀ -CAR et MP ₃₀ -CD46	89

Figure 44. Complexité des protéines transmembranaires étudiées	89
Figure 45. Cartes des plasmides pCEP4 et pEGFP-CFTR	97
Figure 46. Schéma illustrant le principe de purification de l'ADN sur colonne de silice.....	98
Figure 47. Cartes des plasmides pCEP4, avec et sans insert	100
Figure 48. Cartes des plasmides pLXRN et pEGFP-CFTR.....	101
Figure 49. Enchaînement de sites de restriction ajoutés au plasmide « vecteur »	101
Figure 50. Transfert des protéines du gel de polyacrylamide à la membrane de nitrocellulose.....	104
Figure 51. Principe de la détection de protéines par western blot.....	104
Figure 52. Schéma du principe de polymérisation en chaîne (PCR).....	106
Figure 53. Schéma illustrant l'étude des vésicules à l'aide de leur mouvement brownien.....	109
Figure 54. Loi de Stokes-Einstein permettant de calculer le diamètre des vésicules par DLS	109
Figure 55. Schéma représentant la technique d'acquisition de données par DLS.....	109
Figure 56. Principe du Nanosight	110
Figure 57. Coculture de neutrophiles et de cellules épithéliales respiratoires.....	112
Figure 58. Schéma illustrant le principe de la cytométrie en flux.....	113
Figure 59. Schéma illustrant le principe du test de fonctionnalité du CFTR par l'utilisation de la sonde DiSBAC ₂ (3)	114
Figure 60. Schéma illustrant le principe du test de fonctionnalité du CFTR par sortie d'ions iodure.	115
Figure 61. Illustrations du protocole mis au point pour le test de fonctionnalité de la protéine CFTR par microvoltmétrie	116
Figure 62. Schéma illustrant le principe du microscope confocal.....	117
Figure 63. Caractéristiques des cellules CHO-GFP-CFTR donneuses d'EV.....	125
Figure 64. Fonctionnalité de la protéine CFTR mesurée à l'aide du test utilisant le DiSBAC ₂ (3)	126
Figure 65. Cinétique d'apparition de signaux GFP+ dans les cellules traitées par les EV CHO-GFP-CFTR	127
Figure 66. Détection d'ARNm GFP-CFTR dans les EV CHO-GFP-CFTR (A et B) et dans les cellules cibles des EV (C et D)	127
Figure 67. Cinétique d'apparition de signaux CFTR+ dans les cellules traitées par les EV CHO-GFP-CFTR	128
Figure 68. Test de fonctionnalité de la protéine CFTR présente dans les cellules cibles des MP ₁₀₀ -CHO-GFP-CFTR à 72h p.t.	129
Figure 69. Caractérisation des cellules Calu-3.....	133
Figure 70. Clichés de microscopie à épifluorescence de 16HBE	134
Figure 71. Etablissement de la lignée HEK-293-GFP-CFTR	135
Figure 72. Caractérisation des cellules HEK-293-GFP-CFTR	135
Figure 73. Caractérisation des cellules A549-GFP-CFTR.....	135
Figure 74. Etude des cellules A549-Ad5-GFP-CFTR dans le temps.....	136
Figure 75. Caractérisation des cellules A549-Ad5-GFP-CFTR	137
Figure 76. Dose-réponse du vecteur Ad5-GFP sur les A549.....	137
Figure 77. Clichés de microscopie électronique des EV produites par les A549.....	138
Figure 78. Diffusion dynamique de la lumière des EV produites par les Calu-3	138
Figure 79. Western blots anti-Tsg101 et anti-CD63	139
Figure 80. Cytométrie en flux d'EV A549-Ad5-GFP-CFTR marquées avec l'acridine orange.....	140
Figure 81. Profil de taille des EV-A549-Ad5-GFP-CFTR obtenu par la technologie NTA	141
Figure 82. RT-PCR CFTR sur les EV produites par les Calu-3.....	141
Figure 83. RT-PCR CFTR sur les trois fractions d'EV produites par les A549-Ad5-GFP-CFTR.....	142
Figure 84. Western blot caractéristiques des EV-A549-Ad5-GFP et A549-Ad5-GFP-CFTR.....	142

Figure 85. Cytométrie en flux d'EV produites par les A549 transduites par les vecteurs adénoviraux	143
Figure 86. Test de cytotoxicité des EV sur les A549 et les CF15.....	143
Figure 87. Semi-quantification des MV-BHK-CFTR-HA par cytométrie en flux	144
Figure 88. Détection d'ARNm CFTR dans les MV-BHK-CFTR-HA	144
Figure 89. Détection de la protéine GFP dans les CHO-GFP-CFTR par cytométrie en flux.....	145
Figure 90. Test de cytotoxicité des MV-A549-Ad5-GFP-CFTR produites en présence d'ionophore du calcium A23187	145
Figure 91. Test de fonctionnalité des CF15 cibles des EV Calu-3	146
Figure 92. Dose-réponse des EV-A549-Ad5-GFP-CFTR sur les cellules cibles A549, étudiée par cytométrie en flux	147
Figure 93. Suivi par cytométrie en flux du signal GFP dans les cellules cibles CF15 traitées par les EV-A549-Ad5-GFP-CFTR	147
Figure 94. RT-PCR GFP-CFTR sur CF15, cellules cibles des EV A549-Ad5-GFP-CFTR	148
Figure 95. qRT-PCR GFP-CFTR sur CF15, cellules cibles des EV A549-Ad5-GFP-CFTR, en fonction du temps.....	148
Figure 96. Test de fonctionnalité de la protéine GFP-CFTR dans les CF15, cellules cibles des EV-A549-Ad5-GFP-CFTR.....	149
Figure 97. Cinétique et microscopie confocale des cellules A549 et CF15, cibles des EV-GFP.....	150
Figure 98. Effet d'inhibiteurs métaboliques sur l'internalisation des EV-GFP dans les A549 et les CF15	151
Figure 99. Etude de l'effet de la température sur l'internalisation des EV-GFP dans les cellules A549 et CF15.....	152
Figure 100. A549 traitées par les EV-GFP et observées en MET	153
Figure 101. Images de microscopie confocale de cellules A549, cibles des EV-GFP	154
Figure 102. Intensité de fluorescence et pourcentage de cellules A549 GFP +, cibles des EV-GFP, à T+6h.....	155
Figure 103. Cinétique d'apparition du signal GFP dans les cellules A549 traitées par les EV-A549-Ad5-GFP en présence ou non de BafA1 (cytométrie en flux)	155
Figure 104. Images ISX des cellules CF15 traitées par les EV A549-Ad5-GFP-CFTR en présence ou non de BafA1	156
Figure 105. Cytométrie en flux de neutrophiles marqués en violet et issus d'une coculture avec des A549-Ad5-GFP-CFTR	157

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différents transporteurs ABC humains : fonctions et localisations chromosomiques, cellulaires ou tissulaires	35
Tableau 2. Les transporteurs ABC impliqués dans des maladies	36
Tableau 3. Fréquence des mutations du gène CFTR	50
Tableau 4. Fréquence des génotypes responsables de la mucoviscidose	53
Tableau 5. Composition des gels de polyacrylamide	103
Tableau 6. Anticorps utilisés pour les western blots.....	104
Tableau 7. Séquences des amorces utilisées pour les expériences de PCR et qRT-PCR	107
Tableau 8. Concentrations et impacts des inhibiteurs métaboliques utilisés pour étudier le mécanisme de transfert des EV.....	111
Tableau 9. Proportions de protéines GFP+ et quantités d'ARNm GFP-CFTR détectées dans les EV produites par les CHO-GFP-CFTR.....	126

Liste des abréviations et acronymes

A

α -MEM : *Minimum Essential Media alpha*

ABC : *ATP-Binding Cassette*

Ad : Adénovirus

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire, synthétisé à partir de l'ARNm

AMPC : Adénosine MonoPhosphate cyclique

APS : *Ammonium PerSulfate*

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

ASL : *Airway Surface Liquid* liquide de surface des voies aériennes

A, T, G, C : bases azotées de l'ADN : Adénine, Thymine, Guanine, Cytosine

ATP : Adénosine Tri Phosphate

B

BCRP : *Breast Cancer Resistance Protein*

BmrA : *Bacillus multidrug resistance ATP*

BSA : *Bovin Serum Albumin* albumine de sérum bovin

C

CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* régulateur de la conductance transmembranaire

CHO : *Chinese Hamster Ovary cells*, cellules ovariennes de hamster chinois

CRCM : Centres de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose

D

DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole

DLS : *Dynamic Light Scattering*, diffusion dynamique de la lumière

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DNA : *DeoxyriboNucleic Acid* (ADN)

DTT : DiThioThréitol

dNTP : désoxyriboNucléotide-Tri-Phosphate

E

EBNA-1 : *Epstein–Barr virus nuclear antigen 1*

ECL : *ExtraCellular Loop* : boucle extracellulaire

EDTA : *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*

EGFP : *Enhanced Green Fluorescence Protein*

ESCRT : *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

EV : *Extracellular Vesicles* vésicules extracellulaires, regroupe les MV et les Exo

Exo : Exosomes

F

FACS : *Fluorescence Activated Cell Sorting*

G

GFP : *Green Fluorescence Protein*

GPI: *Glycosylphosphatidylinositol*

H

HA : *Human influenza hemagglutinin*

HAEC : *Human Airway Epithelial Cells*

HRP : *HorseRadish Peroxidase* peroxydase de Raifort

HRS : *Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate*

I

IBMX : 3-IsoButyl-1-MethylXanthine

ICL : *IntraCellular Loop*

IL-1 β : Interleukine 1 β

ILV : *IntraLuminal Vesicles*

K

kb : kilobase

L

LAMP : *Lysosome-Associated Membrane Protein*

LBPA : *Lyso(Bis)Phosphatidic Acid*

LB : *Lysogeny Broth*, bouillon lysogène, ou Luria-Bertani

M

M : molaire, mol.L⁻¹

MCS : *Multiple Cloning Site*, site multiple de clonage

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MHC : *Major Histocompatibility Complex*

MMP : *Matrix MetalloProteinase*

MOI : *Multiplicity Of Infection*

MP : *MicroParticules membranaires* (ancienne nomenclature des EV)

MRP1 : *Multidrug Resistance Protein*

MSD : *Membrane-Spanning Domain*

MV : MicroVésicules

MVB : *MultiVesicular Bodies* corps multivésiculaires

N

NBD : *Nucleotide-Binding Domain* domaine de liaison à l'ATP

NIS : *Na/I Symporter*

nt : nucléotide

P

pb : paire de base

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

PC : PhosphatidylCholine

PCL : *Periciliary Fluid Layer* liquide périciliaire

pCMV : promoteur du CytoMégaloVirus

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, réaction de polymérisation en chaîne

PE : PhosphatidylEthanolamine

PFA : ParaFormAldéhyde

PFU : *Plaque-Forming Unit*

P-gp : *Permeability-GlycoProtein* glycoprotéine P

PS : PhosphatidylSérine

pS : picoSiemens

R

RT : *Room Temperature* température ambiante

RT-PCR : *Reverse Transcription PCR*, PCR précédée d'une étape de transcription inverse

S

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl-Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis* Electrophorèse en Gel de PolyAcrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SM : SphingoMyéline

SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion Attachment protein (SNAP) Receptors*

SUR : *SulfonylUrea Receptor*

SV-40 : *Simian Vacuolating Virus 40*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TBE : Tris Borate EDTA

TBS : *Tris-Buffered Saline*

TBS-T : *Tris-Buffered Saline -Tween 20*

TEMED : N,N,N',N'-TETraMéthylEthylèneDiamine

TMD : *TransMembrane Domain*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

Tris : TRIShydroxyméthylaminométhane (2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol)

TSG-101 : *Tumor Susceptibility Gene 101*

V

v-ATPases : ATPases à protons de type vacuolaire

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VLP : *Virus-Like Particles*

I. INTRODUCTION

A. Rappels bibliographiques

1 Les transporteurs ABC

1.1 Introduction générale

Les cellules qui composent notre organisme sont délimitées par une bicouche lipidique hydrophobe qui constitue une véritable barrière garantissant leur intégrité. Cette barrière est perméable aux gaz et aux petits composés hydrophobes qui peuvent diffuser de manière passive. En revanche, elle est imperméable aux ions et aux molécules organiques chargées, qui peuvent constituer des nutriments, des déchets métaboliques, mais aussi des signaux de régulation. La biologie des cellules est donc dépendante de la présence de protéines enchâssées dans les membranes biologiques : les protéines transmembranaires (Figure 1). Celles-ci permettent le passage, plus ou moins sélectif, des solutés du milieu extracellulaire vers le cytoplasme et inversement, mais aussi entre les différents compartiments intracellulaires. Elles peuvent être ouvertes en permanence, ou excitables selon divers stimuli. Le transport des solutés peut s'effectuer dans le sens du gradient électrochimique de la molécule, il est alors qualifié de passif. Dans le cas contraire, il sera actif et nécessitera soit un apport d'énergie (actif primaire) soit le co-transport d'un autre soluté (actif secondaire).

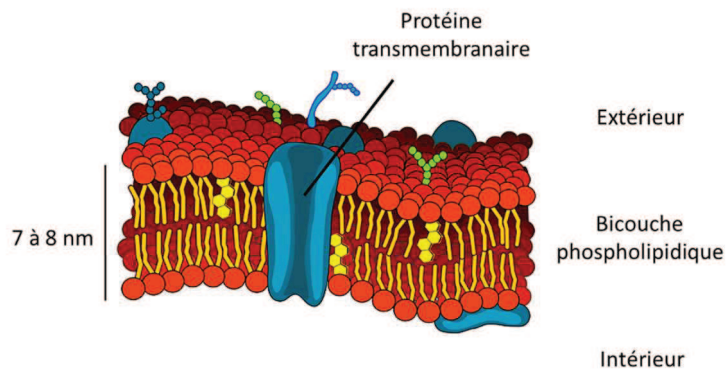


Figure 1. Schéma d'une membrane biologique
(adapté de LadyofHats, Wikimedia Commons, DP)

Les transporteurs ABC, ou transporteurs à *ATP-Binding Cassette*, constituent une grande famille de protéines transmembranaires ubiquitaires, présentes dans les trois branches du vivant : archaebactéries, eucaryotes et procaryotes. Il s'agit de transporteurs actifs primaires qui transforment l'énergie chimique fournie par l'ATP en énergie mécanique. Parmi leurs différents rôles, le transport unidirectionnel de diverses substances à travers les membranes biologiques est largement majoritaire chez les eucaryotes. Chez l'Homme, 48 gènes codent des transporteurs ABC.

1.2 Structure des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC ont une structure modulaire. Un module est constitué d'un domaine de liaison à l'ATP nommé NBD pour *Nucleotide-Binding Domain*, suivi ou précédé d'un domaine transmembranaire nommé TMD pour *TransMembrane Domain*, ou MSD pour *Membrane Spanning Domain* (Schneider and Hunke, 1998). Pour être fonctionnels, les transporteurs ABC doivent présenter au minimum deux modules (Higgins, 1992), c'est-à-dire au moins deux NBD et deux TMD (Figure 2). Les demi-transporteurs, qui sont composés d'un seul module, doivent donc s'associer en homo- ou hétérodimères pour être fonctionnels (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). C'est le cas, par exemple, d'ABCG2 ou BRCP, *Breast Cancer Resistance Protein*, qui remplit un rôle de protection contre les

drogues et les xénobiotiques, notamment au niveau des intestins, du foie, de la barrière hématoencéphalique et du placenta (Ni et al., 2010).

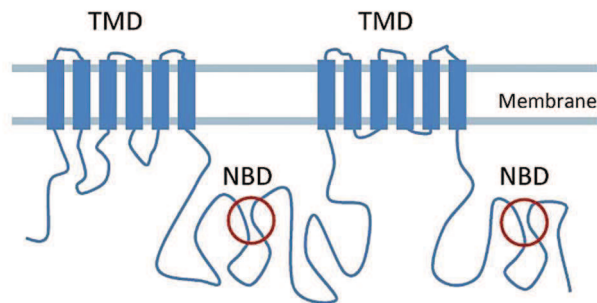


Figure 2. Schéma de la structure d'un transporteur ABC entier (Kavishe et al., 2009)

1.2.1 Les NBD

Les NBD sont cytoplasmiques et hydrophiles. Ils permettent la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, fournissant l'énergie nécessaire à la traversée du substrat. Les NBD sont très conservés entre les familles ainsi qu'entre les espèces, et donnent leur nom à la superfamille des transporteurs ABC « ATP-binding cassette ». Les NBD contiennent différents motifs caractéristiques (Figure 3) tels que Walker A et Walker B qui sont retrouvés dans les protéines liant l'ATP (Walker et al., 1982), mais également le motif C, de séquence LSGGQ, qui est la signature des transporteurs ABC et les distingue des autres protéines liant l'ATP (Higgins et al., 1988). D'autres motifs caractéristiques sont les boucles Q, D et H, moins conservés mais contenant des acides aminés proches. Il est intéressant de noter que les sites de liaison de l'ATP sont composites : la signature d'un domaine vient compléter les motifs A et B de Walker de l'autre domaine pour former un site de liaison complet à l'interface des deux NBD (Smith et al., 2002).

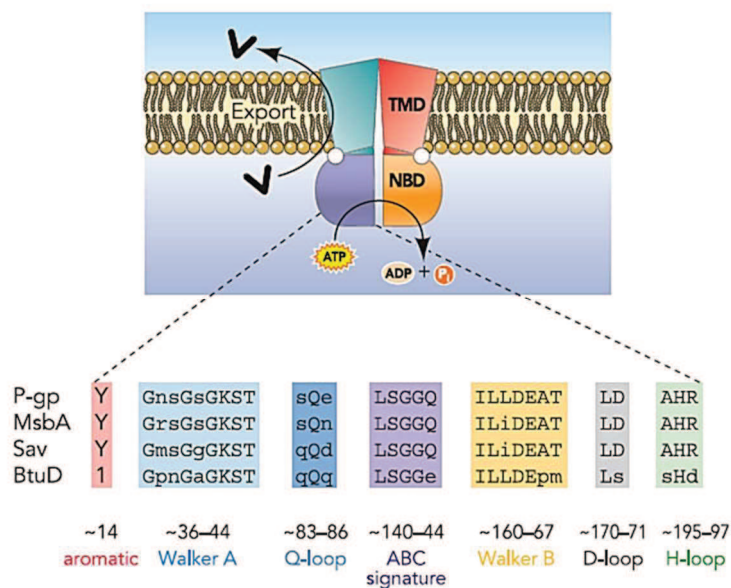


Figure 3. Les motifs caractéristiques des transporteurs ABC (Linton, 2007)

1.2.2 Les TMD

Les TMD sont des domaines hydrophobes, structurés en hélices alpha. Ils contiennent généralement 6 domaines transmembranaires, ce nombre pouvant varier de 5 à 11. L'assemblage de deux TMD permet l'insertion du transporteur dans la membrane biologique. Par ailleurs, ils constituent le site de liaison et de translocation du substrat. Les TMD présentent davantage de variabilité par rapport aux NBD, ce qui est en adéquation avec la diversité des substrats transportés (Biemans-Oldehinkel et al., 2006).

1.2.3 Classification des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC sont regroupés en 7 classes allant de A à G. Cette classification, nommée HUGO pour *HUman Genome Organisation*, est basée sur la similarité structurale des protéines, sur l'organisation des domaines et sur les homologies de séquence des NBD ou des TMD (Dean et al., 2001). Les protéines ABCE et ABCF sont atypiques puisqu'elles ne possèdent pas de domaine transmembranaire. Elles sont localisées dans le cytoplasme ou dans le noyau et n'assument pas de fonction de transporteur mais par exemple de réparation de l'ADN ou de régulation de gènes (Stolarczyk et al., 2011) (George and Jones, 2012).

1.3 Mécanisme des transporteurs ABC

Le mécanisme d'export des transporteurs ABC est très discuté au sein de la communauté scientifique. Il était admis que la fixation du substrat stimulait l'hydrolyse de l'ATP, et que l'énergie ainsi libérée entraînait l'export du substrat (Senior and Bhagat, 1998). Il semblerait que ce soit simplement la fixation, et non l'hydrolyse, de l'ATP qui soit responsable de l'export du substrat. C'est ce que propose le modèle « ATP switch » qui se décompose en quatre étapes majeures (Linton, 2007). La première étape de ce modèle est la fixation spécifique du substrat au niveau des TMD (Figure 4-1). Cette fixation provoque un changement de conformation des NBD, qui a pour conséquence d'augmenter leur affinité pour l'ATP (Figure 4-2). Celui-ci se fixe alors au niveau des NBD, entraînant la formation d'un dimère. La formation de ce sandwich engendre le changement conformationnel des TMD, provoquant la translocation du substrat. L'hydrolyse du phosphate γ de l'ATP (Figure 4-3) déstabilise ensuite le dimère de NBD qui permet au transporteur ABC de retrouver une conformation propice à une nouvelle fixation du substrat (Figure 4-4). Un autre modèle plus récent, nommé « contact constant », suggère que les molécules d'ATP seraient hydrolysées tour à tour, sans qu'il y ait dissociation complète du dimère de NBD (Jones and George, 2009). Les structures cristallographiques disponibles tendent à conforter le modèle « ATP switch » puisque l'on observe effectivement les deux conformations, ouvertes et fermées (Figure 5). Cependant, cette technique comporte un biais : les protéines ne peuvent être observées selon un mode dynamique, laissant encore ouverte la question de la détermination du mécanisme des transporteurs ABC.

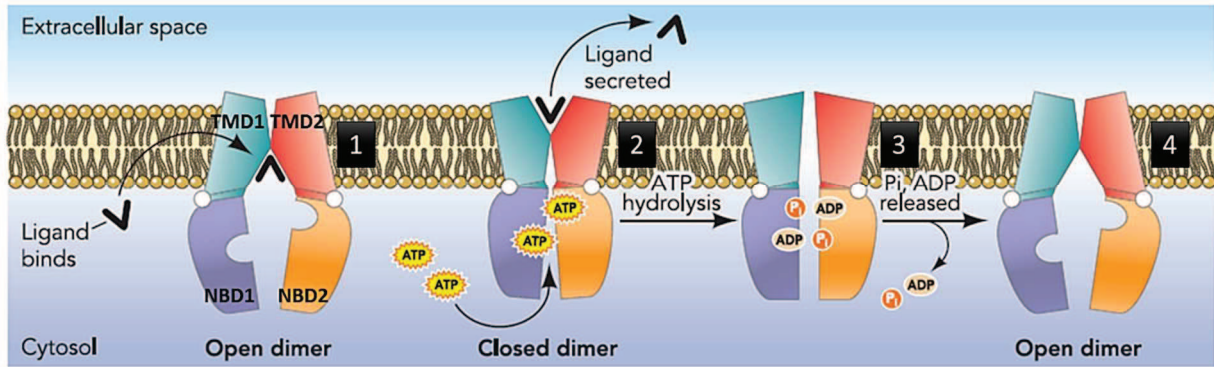


Figure 4. Schéma du mécanisme d'export des transporteurs ABC selon le modèle « ATP switch »
Adapté de (Linton, 2007)

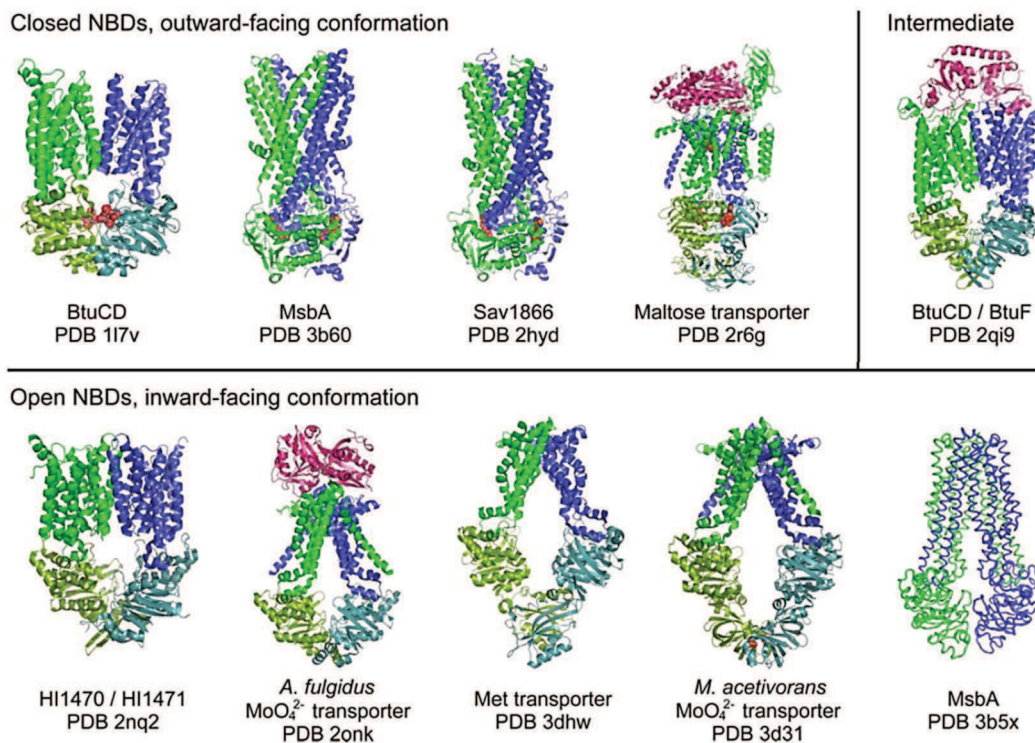


Figure 5. Structures cristallographiques de transporteurs ABC
(Procko et al., 2009)

1.4 Fonctions et rôles physiologiques des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC jouent un rôle fondamental dans la cellule, qu'ils soient localisés à la membrane plasmique ou au niveau des organites tels que le réticulum endoplasmique, les peroxysomes, les lysosomes, ou encore la mitochondrie. Ils sont responsables du transport actif d'une grande variété de composants à travers les membranes biologiques, tels que les acides aminés et oligopeptides, les polysaccharides, les lipides, les nucléosides, les ions, le cholestérol, les stéroïdes, les glucocorticoïdes, les mycotoxines, les antibiotiques, les métaux lourds, les drogues, ou encore les porphyrines (Kuchler, 2011) (Krishnamurthy and Schuetz, 2011). Ainsi, les transporteurs ABC participent notamment à l'homéostasie et à la détoxification des cellules. Les différentes fonctions des transporteurs ABC ainsi que leur localisation sont répertoriées dans le Tableau 1.

Symbol	Alias	Location	Mouse Location	Expression	Function
ABCA1	ABC1	9q31.1	4 23.1	Ubiquitous	Cholesterol efflux onto HDL
ABCA2	ABC2	9q34	2 12.6	Brain	Drug resistance
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3		Lung	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	3 61.8	Rod photoreceptors	N-retinylidene-PE efflux
ABCA5		17q24	11 69	Muscle, heart, testes	
ABCA6		17q24	11 69	Liver	
ABCA7		19p13.3	10 44	Spleen, thymus	
ABCA8		17q24	11 69	Ovary	
ABCA9		17q24	11 69	Heart	
ABCA10		17q24		Muscle, heart	
ABCA12		2q34		Stomach	
ABCA13		7p11-q11		Low in all tissues	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	5 1.0	Adrenal, kidney, brain	Multidrug resistance
ABCB2	TAP1	6p21	17 18.6	All cells	Peptide transport
ABCB3	TAP2	6p21	17 18.6	All cells	Peptide transport
ABCB4	PGY3	7q21.1	5 1.0	Liver	PC transport
ABCB5		7p14		Ubiquitous	
ABCB6	MTABC3	2q36		Mitochondria	Iron transport
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	X 39	Mitochondria	Fe/S cluster transport
ABCB8	MABC1	7q36		Mitochondria	
ABCB9		12q24		Heart, brain	
ABCB10	MTABC2	1q42	8 67	Mitochondria	
ABCB11	SPGP	2q24	2 39	Liver	Bile salt transport
ABCC1	MRP1	16p13.1	16	Lung, testes, PBMC	Drug resistance
ABCC2	MRP2	10q24	19 43	Liver	Organic anion efflux
ABCC3	MRP3	17q21.3		Lung, intestine, liver	Drug resistance
ABCC4	MRP4	13q32		Prostate	Nucleoside transport
ABCC5	MRP5	3q27	16 14	Ubiquitous	Nucleoside transport
ABCC6	MRP6	16p13.1		Kidney, liver	
CFTR	ABCC7	7q31.2	6 3.1	Exocrine tissues	Chloride ion channel
ABCC8	SUR	11p15.1	7 41	Pancreas	Sulfonylurea receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	6 70	Heart, muscle	
ABCC10	MRP7	6p21		Low in all tissues	
ABCC11		16q11-q12		Low in all tissues	
ABCC12		16q11-q12		Low in all tissues	
ABCD1	ALD	Xq28	X 29.5	Peroxisomes	VLCFA transport regulation
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	15 E-F	Peroxisomes	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	3 56.6	Peroxisomes	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	12 39	Peroxisomes	
ABCE1	OABP, RNS4I	4q31		Ovary, testes, spleen	Oligoadenylate binding protein
ABCF1	ABC50	6p21.33	17 20.5	Ubiquitous	
ABCF2		7q36	13 40	Ubiquitous	
ABCF3		3q25	16 22	Ubiquitous	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	17 A2-B	Ubiquitous	Cholesterol transport?
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	6 28-29	Placenta, intestine	Toxin efflux, drug resistance
ABCG4	White2	11q23	5 59	Liver	
ABCG5	White3	2p21	17	Liver, intestine	Sterol transport
ABCG8		2p21	17	Liver, intestine	Sterol transport

PBMC, peripheral blood mononuclear cells; VLCFA, very long chain fatty acids.

Tableau 1. Les différents transporteurs ABC humains : fonctions et localisations chromosomiques, cellulaires ou tissulaires (Dean et al., 2001)

1.5 Maladies associées aux transporteurs ABC

Les transporteurs ABC étant essentiels à la cellule, leur sur- ou sous-expression peuvent engendrer des maladies graves ou des complications (Tableau 2).

ABC Protein	Pseudonym	Ligand(s)/Function	Associated Disease(s)
ABC1	ABCA1	Cholesterol	Tangier disease
ABCR	ABCA4	Retinal	Various eye diseases
TAP1/2	ABCB2/B3	Peptides	Bare lymphocyte syndrome
ABCB7	ABCB7	Iron	Anemia and XLSA
MRP6	ABCC6	?	Pseudoxanthoma elasticum
ALD	ABCD1	vlcFA	Adrenoleukodystrophy
Sterolin1/2	ABCG5/G8	Sterols	Sitosterolemia
PGY3/MDR3	ABCB4	Phosphatidylcholine	Liver disease: PFIC3, OC
BSEP/SPGP	ABCB11	Bile acids	Liver disease: PFIC2
MRP2	ABCC2	Conjugated bilirubin	Liver disease: D-J syndrome
MDR1	ABCB1	Hydrophobic drugs	Failure of chemotherapy
BCRP/MXR	ABCG2	Hydrophobic drugs	
MRP1	ABCC1	Conjugated drugs	
MRP4	ABCC4	Conjugated nucleosides	
Atypical ABC proteins			
CFTR	ABCC7	Chloride ion channel	Cystic fibrosis
SUR	ABCC8	Regulation of K_{IR} channel	PHHI
SMC1-6		Chromosome maintenance	
Rad50		DNA, telomere repair	
Elf1p		mRNA trafficking	

XLSA, X-linked sideroblastic anemia; PFIC, progressive familial intrahepatic cholestasis; OC, obstetric cholestasis; D-J, Dubin-Johnson syndrome; PHHI, persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.

Tableau 2. Les transporteurs ABC impliqués dans des maladies
(Linton, 2007)

1.5.1 La surexpression de transporteurs ABC entraîne une résistance aux traitements

Dans les cellules cancéreuses, certains transporteurs ABC sont surexprimés, comme la glycoprotéine P (P-gp, ou ABCB1), MRP1 (*Multidrug Resistance Protein*, ou ABCC1) ou encore BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*, ou ABCG2) (Benderra et al., 2004). La surexpression de ces transporteurs a pour effet de protéger les cellules cancéreuses contre les agents chimiothérapeutiques, en les expulsant hors de la cellule. Cette chimiorésistance diminue grandement l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Une des approches thérapeutiques du cancer consiste à mettre au point des inhibiteurs spécifiques de ces transporteurs. Cette approche est très contrôlée puisque les transporteurs sont également présents à des endroits stratégiques de l'organisme où ils ne doivent pas être inhibés. Différents types de composés, tels que les méthoxy-stilbènes (Valdameri et al., 2012), donnent des résultats encourageants *in vitro* puisqu'ils sont spécifiques et non cytotoxiques.

Chez les procaryotes, la surexpression de certains transporteurs ABC peut également induire la résistance bactérienne aux antibiotiques, c'est le cas par exemple de BmrA de *Bacillus subtilis* (Steinfels et al., 2004).

1.5.2 La sous-expression des transporteurs ABC à l'origine de maladies graves

Plusieurs maladies ont été recensées comme étant dues à la sous-expression d'un transporteur ABC. La diversité des composés transportés explique la multiplicité des maladies observées (Tableau 2).

La sous-expression de ABCD1, transporteur des acides gras à longue chaîne dans les peroxysomes, entraîne par exemple une maladie neurologique, l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (Mosser et al., 1993), qui a pour conséquence la démyélinisation progressive du système nerveux central. La sous-expression de ABCC8 (SUR1), sous-unité régulatrice du canal potassique exprimé par la cellule beta pancréatique, est responsable de l'hyperinsulinémisme familial (Thomas et al., 1995). La sous-expression de ABCA4, transporteur du N-rétinyl-phosphatidyléthanolamine (NR-PE), un dérivé du rétinol, entraîne la dégénérescence maculaire de Stargardt (Allikmets et al., 1997).

La mucoviscidose fait également partie des maladies causée par la sous-expression d'un transporteur ABC : le CFTR (ABCC7).

2 La mucoviscidose

2.1 Introduction générale

La mucoviscidose est une maladie génétique monogénique qui touche aujourd'hui près de 6 800 personnes en France et 70 000 dans le monde. En France, 200 enfants naissent chaque année avec la mucoviscidose, ce qui représente en moyenne 1 nouveau-né sur 4 500. Il s'agit de la plus fréquente des maladies héréditaires potentiellement grave de l'enfance dans les populations d'Europe du Nord-Ouest et d'Amérique du Nord, dites caucasiennes. Elle se transmet selon un mode autosomique récessif et touche principalement les fonctions respiratoire et digestive. Grâce au dépistage néonatal généralisé en France en 2002, à la prise en charge précoce et pluridisciplinaire des patients dans les Centres de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose (CRCM), ainsi qu'aux avancées thérapeutiques réalisées dans différents domaines de recherche, la mucoviscidose n'est plus aujourd'hui une maladie uniquement de l'enfant. 50% des patients sont adultes, et l'espérance de vie à la naissance est passée de 7 ans en 1965 à 50 ans en 2015. Ces chiffres sont très encourageants pour la communauté scientifique, pour qui le défi de corriger l'origine de la mucoviscidose sur le plan moléculaire est toujours présent.

2.2 Historique

Dès le Moyen-Age, il est rapporté que les « baisers salés » réalisés sur le front des nouveau-nés étaient un funeste présage. En 1595, grâce à des autopsies de ces enfants « ensorcelés », Pieter Pauw décrit des lésions pancréatiques. Au XX^{ème} siècle, ces anomalies pancréatiques sont associées à des maladies pulmonaires ; et c'est en 1936 que le pédiatre Guido Fanconi décrit pour la première fois la maladie, sous le nom de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie » (Busch, 1990), (Quinton, 1999). Elle sera considérée comme une entité pathologique distincte en 1938 par la pédiatre Dorothy Andersen (Andersen, 1938). L'espérance de vie était alors de 6 mois seulement.

Le médecin Sydnor Farber, convaincu que cette maladie est due à une diffusion généralisée de mucus visqueux, la renomme en 1943 « mucoviscidose », en associant les termes « mucus » et « visqueux » (Farber, 1943). Le caractère héréditaire de la maladie et son mode de transmission récessif furent suggérés en 1946 par Andersen et Hodges (Andersen and Hodges, 1946).

En 1948, le docteur Paul di Sant'Agnese remarque une fréquence anormalement élevée de déshydratations chez les jeunes enfants atteints de mucoviscidose lors d'une vague de chaleur aux Etats-Unis. Il émet l'hypothèse d'une anomalie de composition ionique dans la sueur. C'est en 1953 qu'il démontre les anomalies électrolytiques dans la sueur des malades, conduisant à l'élaboration d'un diagnostic spécifique de la maladie : le test de la sueur (Di Sant'Agnese et al., 1953, Gibson and Cooke, 1959).

Des études physiopathologiques permettent ensuite de comprendre l'origine de la viscosité du mucus. En 1981, Knowles décrit au niveau de la muqueuse nasale un potentiel électrique plus électronégatif chez les patients atteints de mucoviscidose (Knowles et al., 1981) ; et en 1983, Paul Quinton découvre que l'imperméabilité aux ions chlorure au niveau des cellules épithéliales des glandes sudoripares est responsable de l'augmentation d'électrolytes dans la sueur (Quinton, 1983). Dans un même temps, Knowles et Boucher décrivent une réabsorption accrue de sodium (Knowles et al., 1983).

En 1985, le gène impliqué dans la mucoviscidose a été localisé sur le chromosome 7 par l'équipe du docteur Lap-Chee Tsui, puis cloné par des techniques de génétique inverse en 1989 par les équipes de Lap-Chee Tsui, Francis Collins et John Riordan (Kerem et al., 1989) (Riordan et al., 1989) (Rommens et

al., 1989). Cette découverte est une avancée vers une potentielle guérison puisqu'elle permet d'envisager la thérapie génique. Elle apporte également une nouvelle dimension au dépistage de la maladie.

Il sera par la suite confirmé que la protéine impliquée dans la mucoviscidose est bien un canal à ions chlorure (Anderson et al., 1991).

2.3 La mucoviscidose, une origine génétique

2.3.1 Le gène *CFTR*

Le gène impliqué dans la mucoviscidose est le gène *CFTR* (référence NCBI : NM_000492.3). Il est positionné au locus 7q31.2, c'est-à-dire sur le bras long du chromosome n°7, dans la région 31.2 (Figure 6). Sa séquence nucléotidique s'étend de la position 117 465 784 à la position 117 715 971, lui conférant une longueur de 250 kb. Le gène *CFTR* contient 27 exons et sa transcription conduit à un ARNm de 6 132 nt contenant une séquence codante de 4 443 nt (<http://www.ensembl.org/>). La traduction de cet ARNm donne naissance à la protéine CFTR.

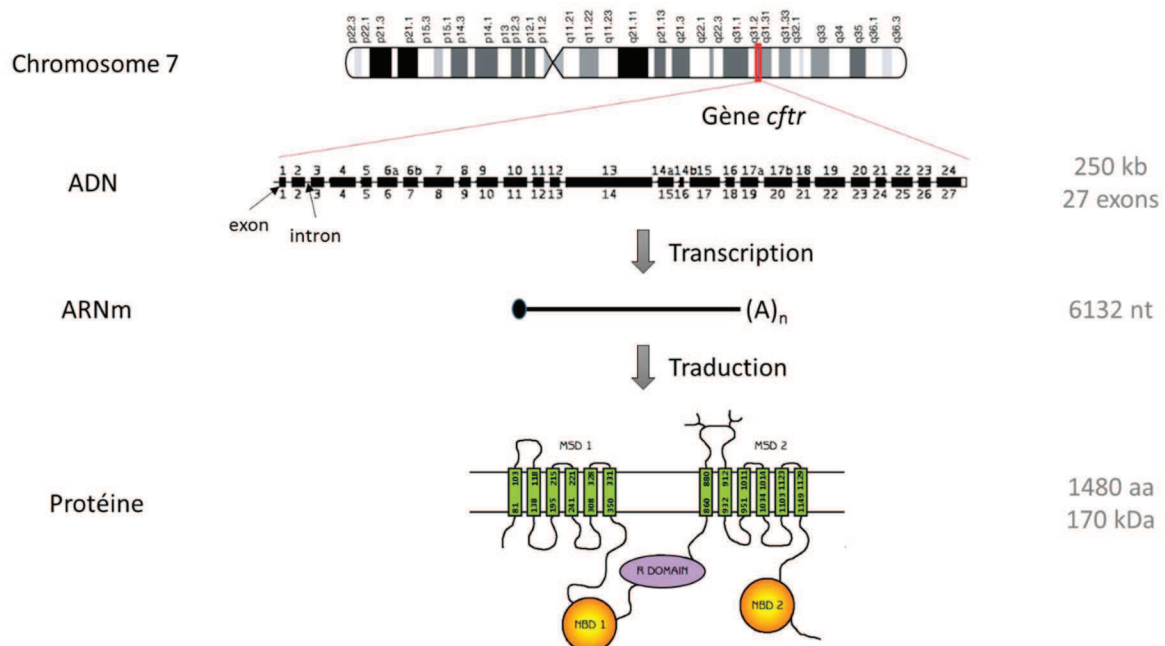


Figure 6. Le gène *CFTR* donne naissance à la protéine *CFTR*
(Image de la protéine extraite et adaptée de <http://physpharm.ohsu.edu/faculty/Dawson>)

2.3.2 La protéine CFTR

2.3.2.1 Structure de la protéine CFTR

La protéine CFTR est une glycoprotéine transmembranaire constituée de 1480 acides aminés. Sa masse molaire est de 168 141 g/mol soit environ 170 kDa. Elle fait partie de la famille des transporteurs ABC (§1p29). Elle est constituée de deux fois 6 domaines transmembranaires notés TMD pour *TransMembrane Domain* ou MSD pour *Membrane Spanning Domain*, et de deux domaines de liaison à l'ATP notés NBD pour *Nucleotide Binding Domain*. La particularité structurale de la protéine CFTR est qu'elle présente également un domaine régulateur R, composé de ~240 résidus d'acides aminés et localisé dans le cytoplasme, entre NBD1 et TMD2 (Figure 7 A & B). Elle contient en outre une extension de ~80 résidus à l'extrémité N-terminale et de ~30 résidus en C-terminal. Ces dernières ont une structure désordonnée, sauf en cas d'interaction avec d'autres protéines (Hunt et al., 2013).

Les protéines transmembranaires sont particulièrement difficiles à étudier par cristallographie du fait de la difficulté à les produire, mais aussi à obtenir un cristal qui soit suffisamment résolutif. L'homologie de séquence permet de prédire la structure tridimensionnelle de la protéine CFTR. Cependant, les domaines transmembranaires sont spécifiques des transporteurs, par conséquent cette région est plus difficilement prédictible. Des modèles de la structure tridimensionnelle de la protéine CFTR sont disponibles (Figure 7 C). Ils ont été établis en 2008 par homologie de séquence avec le transporteur ABC Sav1866 (Mornon et al., 2008) (Serohijos et al., 2008) et ont récemment été enrichis (Dalton et al., 2012) (Rahman et al., 2013). Ces structures tridimensionnelles permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement de la protéine, ainsi que les conséquences des différentes mutations, mais aussi de concevoir de nouvelles molécules à l'aide du *drug design*.

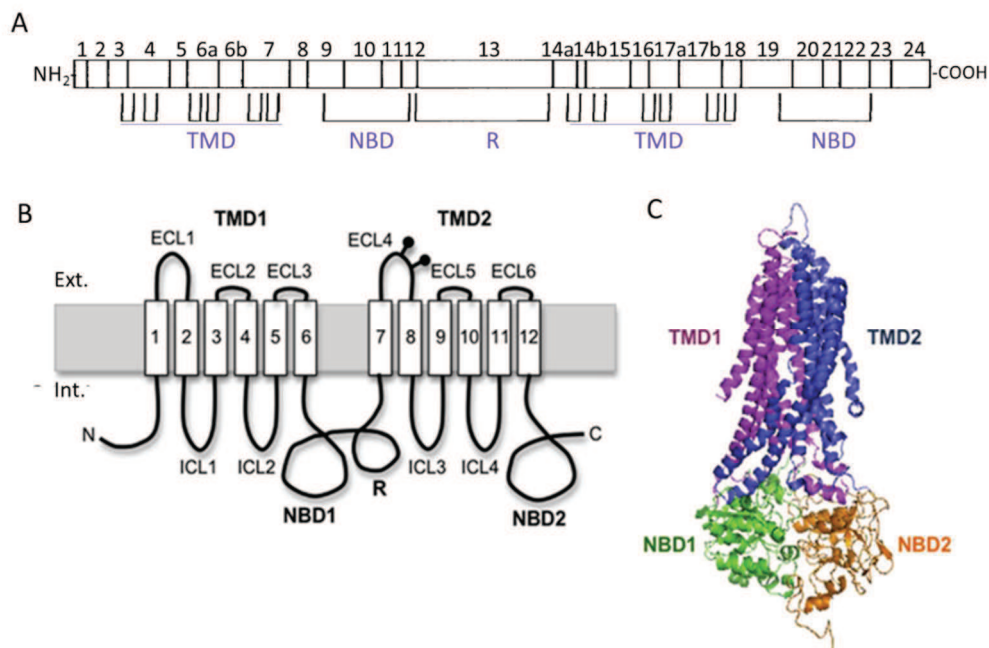


Figure 7. Structure de la protéine CFTR

A. Correspondance structure primaire et tertiaire (Harris, 1992) ; B. Enchaînement des différents domaines
C. Structure tridimensionnelle modélisée (B et C d'après (Kim and Skach, 2012))

2.3.2.2 Régulation de la protéine CFTR

L'ouverture du canal CFTR est séquentielle et régulée intrinsèquement à deux niveaux : le domaine R et les domaines NBD.

La phosphorylation du domaine R est un pré-requis à l'ouverture du canal (Riordan et al., 1989). A l'état déphosphorylé, le canal est fermé (Cotten and Welsh, 1997) et interagit avec le domaine NBD1 (Kanelis et al., 2010). Le domaine R présente environ 20 sites potentiels de phosphorylation (Dahan et al., 2001), le degré de phosphorylation conditionnant la probabilité d'ouverture du canal. Celle-ci est ainsi dépendante de la balance kinase/phosphatase. Les protéines kinases A et C, PKA et PKC, phosphorylent le domaine R (Tabcharani et al., 1991) (Jia et al., 1997), les protéines phosphatases 2A et 2C, PP2A et PP2C, le déphosphorylent et entraînent sa fermeture (Berger et al., 1993) (Luo et al., 1998). La PKA est activée par l'AMPc, lui-même régulé par l'adénylate cyclase responsable de sa synthèse, et par la phosphodiesterase à l'origine de sa dégradation. La phosphorylation de CFTR par la PKC augmenterait l'intensité de sa réponse à la PKA (Dahan et al., 2001).

La phosphorylation du domaine R semble faciliter l'ouverture du canal en interrompant les liaisons entre R et NBD1 (Hunt et al., 2013). Ceci permet un changement de conformation lié à la fixation des molécules d'ATP, suffisante pour entraîner l'ouverture du canal (Vergani et al., 2005). Le domaine NBD1 aurait plus d'affinité pour l'ATP que le domaine NBD2, ce qui contribuerait au maintien à l'état ouvert du canal. L'hydrolyse de l'ATP au niveau du domaine NBD2 entraînerait sa fermeture (Aleksandrov et al., 2000) (Basso et al., 2003). Le mécanisme d'ouverture communément accepté est illustré Figure 8.

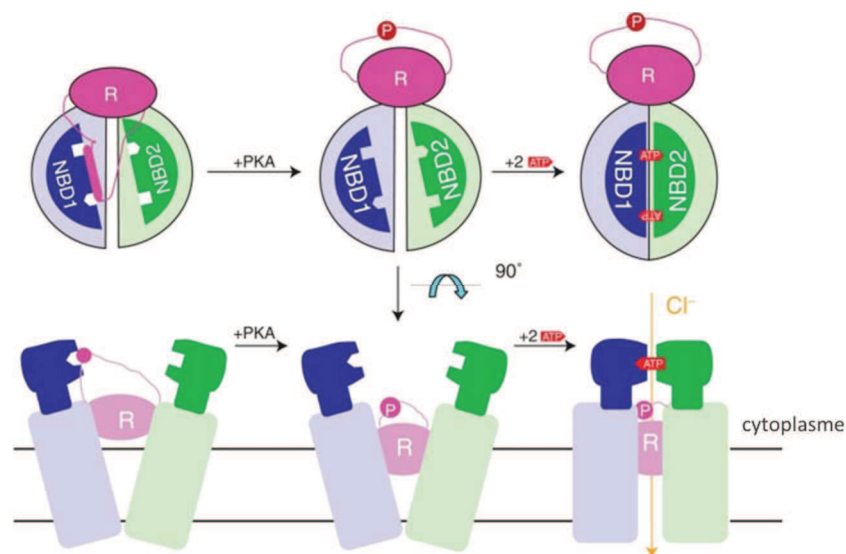


Figure 8. Mécanisme d'ouverture du canal CFTR
(Hunt et al., 2013)

L'énergie fournie par la fixation des molécules d'ATP sur un transporteur ABC permet généralement la translocation d'un substrat à travers les membranes biologiques (§1.3 p33). Dans le cas particulier du CFTR, cette énergie permet l'ouverture du canal. Les ions diffusent ensuite passivement en fonction de leur gradient électrochimique. Dans les cellules épithéliales, ce dernier est généralement favorable à la sortie des ions chlorure. Le phénomène inverse est observé dans les glandes sudoripares afin de limiter les pertes de sel dans la sueur. Ceci explique le « baiser salé » des patients atteints de mucoviscidose (§2.2 p41).

2.3.2.3 Synthèse de la protéine CFTR

La synthèse des protéines est réalisée grâce à l'ARNm, intermédiaire entre la séquence génique d'intérêt localisée dans le noyau, et les unités traductionnelles situées dans le cytoplasme. La transcription de la séquence génique codant la protéine CFTR conduit, après maturation, à un ARNm de 6 132 nt contenant une séquence codante de 4 443 nt (§2.3.1 p42). La traduction associe une succession de trois nucléotides à un résidu d'acide aminé. Dans le cas de CFTR, protéine transmembranaire, la chaîne polypeptidique ainsi générée est transférée au fur et à mesure de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique (Figure 9). Le repliement s'effectue domaine après domaine, à l'aide de protéines chaperonnes, telles que Hsp70 (Yang et al., 1993), Hsp90 (Loo et al., 1998), Hsp40 (Farinha et al., 2002) ou encore la calnexine (Pind et al., 1994), qui protègent la protéine en cours de synthèse de l'agrégation. Elles jouent également le rôle de contrôle qualité. Ainsi, les protéines mal repliées, retenues dans le réticulum endoplasmique, sont ubiquitinylées puis dégradées par le protéasome (Jensen et al., 1995). Il a été montré que les complexes associés au RE (ERAC) destinés à la dégradation peuvent également être dégradés par autophagie (Fu and Sztul, 2009). 70 à 75% des protéines sont ainsi dégradées par le système de contrôle qualité du RE, ce qui suggère une faible efficacité de repliement de la protéine CFTR (Cheng et al., 1990) (Jensen et al., 1995). Cependant, il est intéressant de noter que dans les epithelia reconstitués, 60 à 100% des protéines CFTR sont correctement repliées (Varga et al., 2004).

La forme A, constituée uniquement de la chaîne polypeptidique de masse moléculaire 130 kDa, est la protéine précurseur de CFTR. Elle est rapidement glycosylée sur les résidus asparagine 894 et 900 pour donner la forme B de 140 kDa, également appelée forme immature ou core. Le nom B' est utilisé pour nommer les 30% de protéines correctement repliées. Celles-ci sont transportées jusqu'à l'appareil de Golgi, pour subir la dernière étape de maturation et donner naissance à la forme C, hautement glycosylée. Cette forme mature de la protéine CFTR est finalement conduite à la membrane plasmique par l'intermédiaire des vésicules de transport COPII. La séquence peptidique DTRL, en position C-terminale, joue un rôle majeur dans l'adressage de la protéine à la membrane mais aussi dans son recyclage, grâce à son interaction avec le domaine PDZ de protéines telles que GRASP, NHERF (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor*), ou encore CAL (*CFTR-associated ligand*) (Moyer et al., 2000).

La protéine CFTR a une demi-vie de ~24h (Lukacs et al., 1993). Elle est rapidement internalisée par endocytose. Ces vésicules seront soit éliminées par la voie lysosomale, soit recyclées à la membrane, selon la physiologie de la cellule. Par ailleurs, l'activation du canal par l'AMPc a un effet inhibiteur sur son endocytose (Prince et al., 1994).

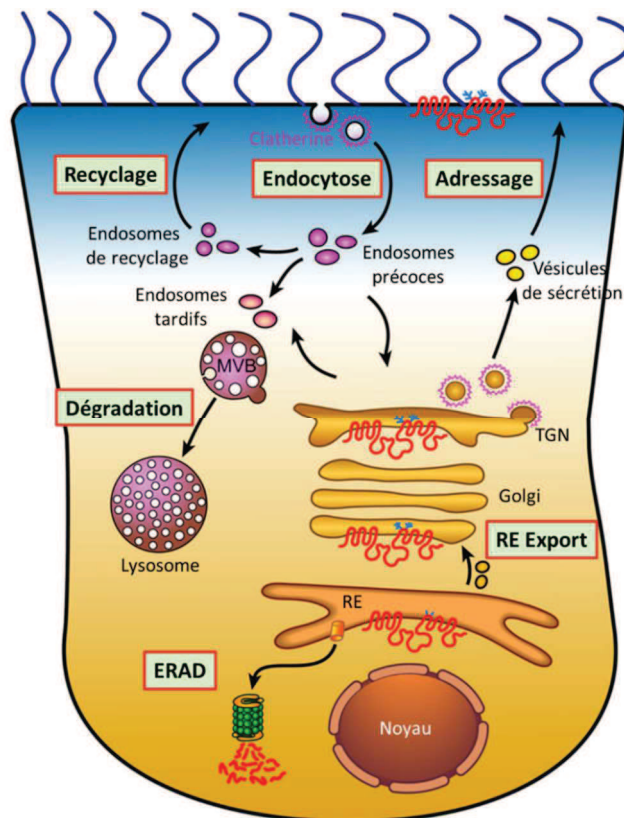


Figure 9. Synthèse de la protéine CFTR
(Hegedus T, 2011)

2.3.2.4 Fonctions de la protéine CFTR

La protéine CFTR est localisée au pôle apical des cellules épithéliales, exprimée davantage dans les cellules glandulaires (Engelhardt et al., 1992). Elle assure la fonction de canal ionique, majoritairement chlorure, ainsi que celle de régulateur d'autres canaux ioniques. Elle a donc une contribution essentielle à l'hydratation du mucus, nécessaire à la clairance mucociliaire (Figure 10).

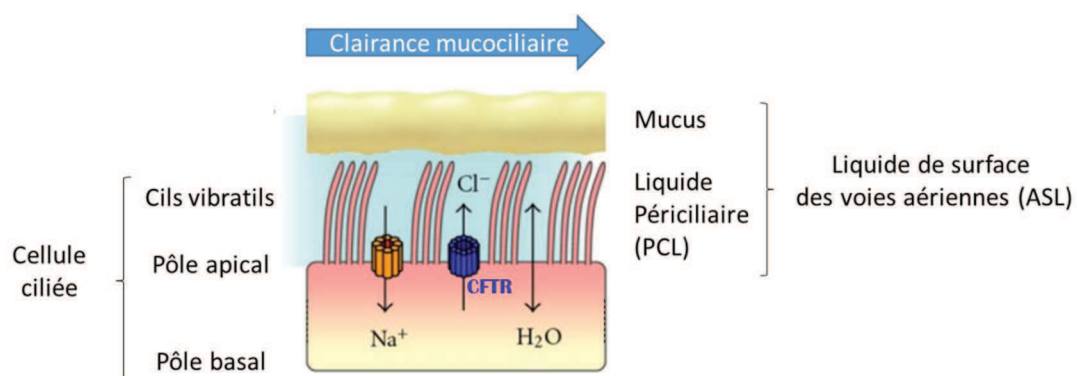


Figure 10. La protéine CFTR contribue à la clairance mucociliaire
Adapté de (Reeves et al., 2012)

2.3.2.4.1 Canal ionique

Dans la famille des transporteurs ABC, la protéine CFTR est la seule à se comporter comme un canal ionique. Ce canal est connu pour être perméable aux ions chlorure, et plus généralement aux halogénures selon la séquence suivante $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Anderson et al., 1991). Elle est également impliquée dans le transport d'anions polyatomiques, comme les ions bicarbonate (HCO_3^-) (Linsdell et al., 1997), qui interviennent dans le tube digestif pour neutraliser l'acide gastrique, ou encore les ions thiocyanate (SCN^-) (Conner et al., 2007) (Childers et al., 2007), qui permettent de détoxifier le peroxyde d'hydrogène tout en produisant de l'hypothiocyanite (OSCN), un agent antimicrobien. Le canal a un diamètre de $\sim 5,3 \text{ \AA}$ (Linsdell et al., 1997) et une conductance de $\sim 10 \text{ pS}$ (Berger et al., 1991).

2.3.2.4.2 Régulateur de canaux ioniques

Le CFTR a tout d'abord été connu pour cette fonction de régulateur de la conductance membranaire, qui, par ailleurs, lui a valu son nom *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*. Il régule l'activité de différents canaux, tels que ORCC, ENaC, ou encore ROMK, selon des mécanismes qui sont encore peu décrits.

ORCC, *Outward Rectifying Chloride Channel*, est également un canal à ions chlorure, distinct du canal CFTR, et qui a longtemps été soupçonné d'être le canal déficient responsable de la mucoviscidose. Il est activé par la PKA et l'ATP, uniquement en présence de CFTR fonctionnel et d'ATP extracellulaire (Jovov et al., 1995).

ENaC, *Epithelial sodium Channel*, est un canal responsable de l'entrée de sodium dans les cellules épithéliales pulmonaires notamment. Il est régulé négativement par le canal CFTR (Reddy et al., 1999), ce qui entraîne une hyperabsorption de sodium chez les patients mucoviscidosiques et contribue à la déshydratation du mucus (Figure 11). De manière intéressante, l'inverse est observé dans les glandes sudoripares, où ENaC est régulé positivement (Kunzelmann, 2001), ce qui contribue à éviter les pertes de sels dans la sueur et conforte l'explication du « baiser salé » chez les patients mucoviscidosiques.

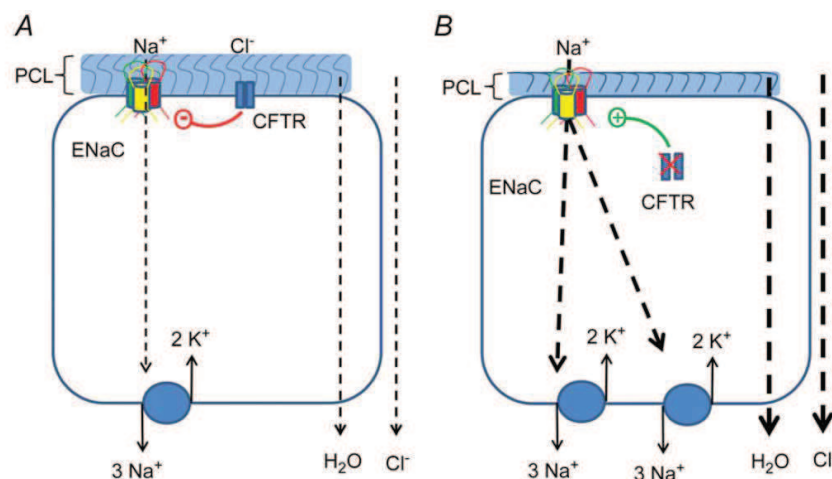


Figure 11. Schéma de la régulation du canal ENaC par CFTR
A. chez un sujet sain ; B. chez un patient mucoviscidosique
(Hobbs et al., 2013)

ROMK, *Renal Outer Medullary potassium channel*, encore appelé Kir1.1 est responsable de la sécrétion de potassium dans les cellules rénales. Il semblerait qu'il soit régulé positivement par ENaC, uniquement en présence de CFTR (Konstas et al., 2002).

2.4 La mucoviscidose, une maladie génétique

2.4.1 Introduction

Des mutations présentes dans le gène *CFTR* entraînent des erreurs de traduction de la protéine (Figure 6 p42) qui ne pourra alors pas assurer ses fonctions biologiques au sein de la cellule (§2.3.2.4 p46). A ce jour, plus de 2 000 mutations du gène *CFTR* sont répertoriées (<http://www.genet.sickkids.on.ca/>). Elles sont localisées uniformément tout au long du gène (Figure 12). Il s'agit majoritairement de mutations faux sens (40%), non-sens (8%), entraînant un décalage du cadre de lecture (16%), ou encore un défaut d'épissage (11%). 14% des mutations sont des variations de séquence, dites silencieuses, qui n'entraînent pas de modification d'acide aminé. Elles peuvent néanmoins impacter la stabilité de l'ARNm.

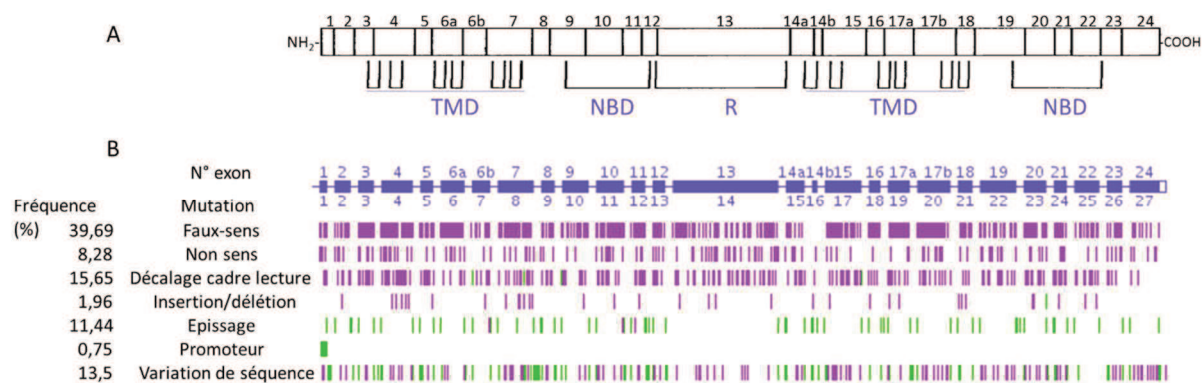


Figure 12. Répartition des différents types de mutation sur le gène *CFTR*
A. (Harris, 1992) ; B. <http://www.genet.sickkids.on.ca/>

2.4.2 Les différentes classes de mutations du gène *CFTR*

Selon l'impact qu'elles ont sur la cellule, les mutations du gène *CFTR* sont regroupées en 6 classes (Figure 13). Les mutations de classe I, II, V et VI affectent la quantité de protéine CFTR, tandis que les classes III et IV affectent sa fonction.

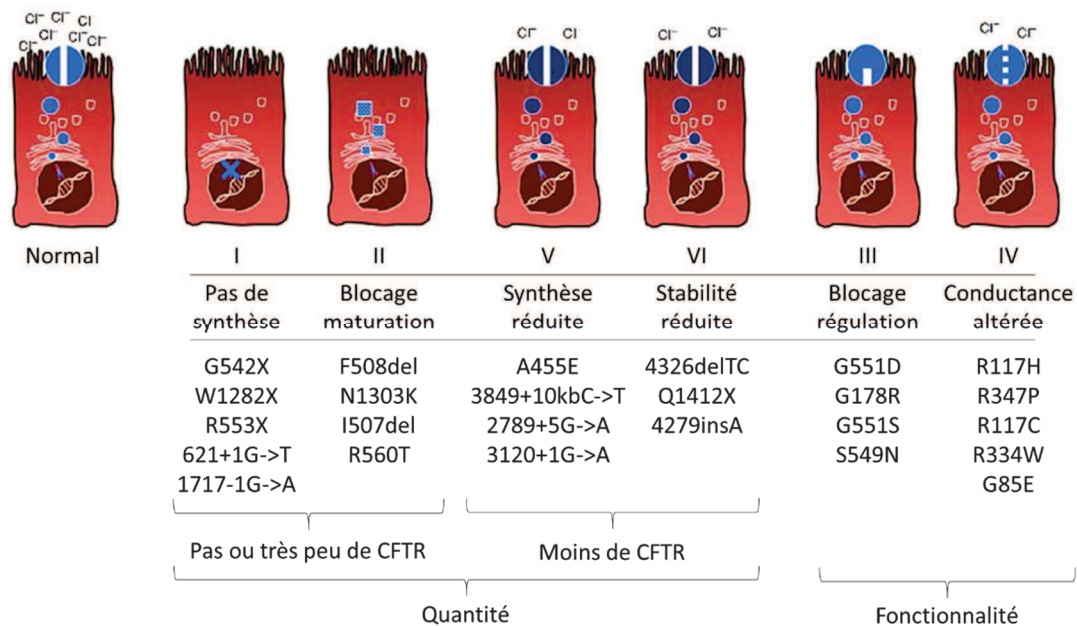


Figure 13. Les 6 classes de mutation du gène CFTR
Adapté de (Quintana-Gallego et al., 2014)

2.4.2.1 Classe I, II, V et VI : défaut de quantité de la protéine CFTR

2.4.2.1.1 Classe I et II : pas ou peu de protéine CFTR à la membrane cellulaire

Les mutations de classe I regroupent les mutations non-sens ainsi que les mutations affectant le cadre de lecture, comme les mutations du site d'épissage. Ces mutations engendrent l'apparition prématurée d'un codon stop noté X. La protéine alors incomplète est dégradée par le protéasome et est totalement absente de la membrane des cellules.

Les mutations de classe II engendrent une anomalie de maturation ou d'adressage de la protéine. Celle-ci est donc la plupart du temps absente de la membrane cellulaire. La mutation la plus fréquente, delF508 (§2.4.3 p50), fait partie de cette classe.

2.4.2.1.2 Classe V et VI : peu de protéine CFTR à la membrane cellulaire

Les mutations de classe V et VI entraînent respectivement un défaut de stabilité de l'ARNm et de la protéine CFTR. Ainsi, il y a soit réduction de synthèse, soit dégradation prématurée de la protéine. Dans les deux cas, la protéine est présente à la membrane cellulaire et elle est fonctionnelle, mais en quantité insuffisante.

2.4.2.2 Classe III et IV : défaut de fonction de la protéine CFTR

Les mutations de classe III engendrent une anomalie de régulation de la protéine CFTR : le canal présente un défaut d'ouverture. La mutation G551D, connue pour être la première mutation à bénéficier d'une thérapie protéique depuis 2012 (§2.5.3.3.1 p60), fait partie de la classe III.

Enfin, les mutations de classe IV sont responsables d'un défaut de conductance de l'ion chlorure : le passage des ions par le canal CFTR est altéré.

2.4.3 La mutation *d*elF508

La mutation du gène *CFTR* nommée *d*elF508 ou F508del correspond à la délétion des trois paires de base codant la phénylalanine en position 508 (Riordan et al., 1989), située au niveau du domaine NBD1. Elle entraîne un défaut de maturation de la protéine CFTR, qui est séquestrée dans le réticulum endoplasmique puis dégradée (Figure 14).

Il s'agit de la mutation la plus couramment observée chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, au moins un exemplaire de cette mutation est retrouvé chez 70% des patients (Tableau 3). Les modèles d'étude de la mucoviscidose sont, par conséquent, très souvent des cellules ou des animaux homozygotes pour cette mutation.

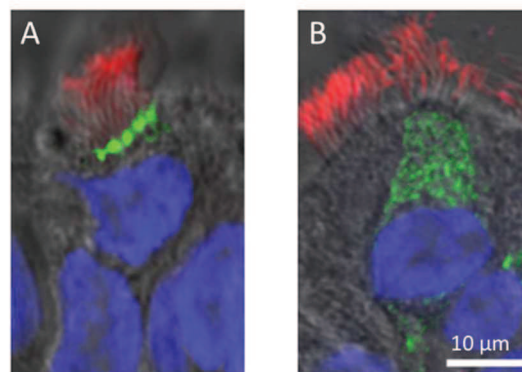


Figure 14. Images de microscopie confocale représentant des cellules épithéliales ciliées. La protéine CFTR, les cils vibratiles et les noyaux sont respectivement marqués par une fluorescence verte, rouge ou bleue.

A. Cellules exprimant le CFTR sauvage, localisé à la membrane apicale
B. Cellules exprimant le CFTR muté, homozygote *d*elF508, retenu dans le RE
Extrait de (Hegedus T, 2011)

Mutation	Fréquence (%)
F508del	68.69
R117H	11.46
G542X	2.56
G551D	2.18
W1282X	1.82
3120+1G>A	1.56
N1303K	1.43
R553X	1.07

Tableau 3. Fréquence des mutations du gène *CFTR*
Seules les mutations dont la fréquence est supérieure à 1% figurent dans ce tableau.
(Zvereff et al., 2014)

2.4.4 Transmission de la maladie

2.4.4.1 La mucoviscidose, une maladie autosomique récessive

L'ADN est présent dans le noyau des cellules sous forme compactée : les chromosomes (Figure 15 A). L'Homme, diploïde, possède deux exemplaires de chaque chromosome. Seules les cellules reproductrices, ovules et spermatozoïdes, sont haploïdes, ce qui conduit à reformer la diploïdie lors de la fécondation. L'enfant hérite ainsi d'un jeu de chromosomes provenant du père et d'un jeu provenant de la mère. La mucoviscidose est autosomique récessive : les deux versions du gène *CFTR*, aussi appelées allèles, doivent être mutés pour que la maladie se déclare. Ainsi, deux parents « porteurs sains », c'est-à-dire ayant un seul allèle muté, ont une « chance » sur 4 d'avoir un enfant malade (Figure 15 B). Il faut savoir que 2 millions de français sont porteurs sains et peuvent transmettre la maladie à leurs enfants.

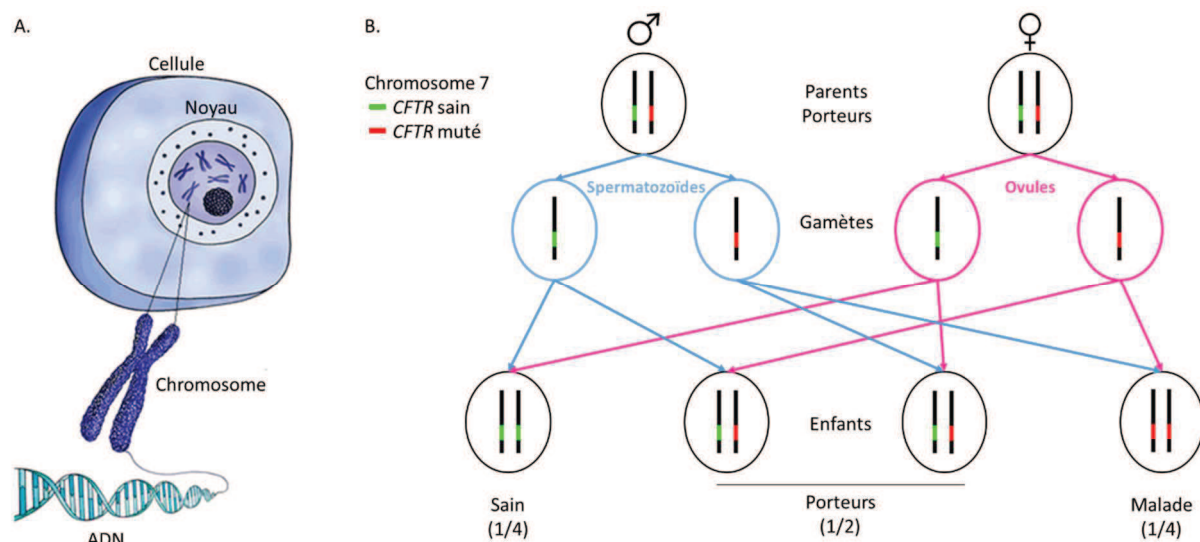


Figure 15. Transmission de la mucoviscidose, maladie autosomique récessive

A. Les gènes sont codés par l'ADN, compacté sous forme de chromosomes et localisé dans le noyau des cellules (adapté de *cysticfibrosismedicine.com*) ; B. Schéma expliquant la transmission de la maladie à partir de deux parents porteurs d'une mutation du gène *CFTR*

2.4.4.2 La persistance des mutations du gène *CFTR* dans les populations

Jusqu'en 1965, la mucoviscidose était une maladie pour laquelle l'espérance de vie n'était que de 7 ans. Aussi, il est surprenant de constater la persistance des mutations du gène *CFTR* dans les populations. Ceci a conduit les chercheurs à mener des études pour savoir quel avantage sélectif était conféré aux porteurs sains. Ils ont tout d'abord émis l'hypothèse selon laquelle une mutation au niveau du gène *CFTR* conférerait une protection contre des maladies épidémiques comme le choléra ou encore la fièvre typhoïde. Des études ont en effet montré que les bactéries responsables de la fièvre typhoïde sont incapables de pénétrer dans les cellules d'individus homozygotes *CFTR* Δ F508, alors qu'elles entrent de manière modérée dans les cellules des porteurs sains, et massivement chez les homozygotes *CFTR**wt* (Gabriel et al., 1993) (Pier et al., 1998). Cependant, de récentes études ont

montré que cette explication ne pouvait pas, à elle seule, expliquer une fréquence aussi élevée de porteurs sains dans les populations, estimée à 2-4% de la population générale occidentale. Il semblerait néanmoins qu'une protection contre la tuberculose le puisse (Poolman and Galvani, 2007). Cette dernière serait due à une réduction de l'activité enzymatique de l'arylsulfatase B, encore connue sous le nom de N-acetyl galactosamine 4-sulfatase, dans les leucocytes de patients mucoviscidosiques (Sharma et al., 2013). Cette enzyme conditionnerait la virulence de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que des différences ethniques dans le maintien de certaines mutations du CFTR pourraient s'expliquer par la persistance de la lactase à l'âge adulte et une alimentation lactée dans les populations européennes, contrairement aux populations asiatiques (Modiano et al., 2007). En outre, il semblerait que les mutations conduisant à un phénotype modéré (§2.4.6.1 p53) soient associées à une meilleure tolérance au lactose (Madry et al., 2011).

2.4.4.3 Dépistage néonatal

Le dépistage néonatal est généralisé en France depuis 2002 et permet ainsi un suivi précoce des patients, contribuant de manière significative à l'augmentation de l'espérance de vie. Il consiste à réaliser un dosage de trypsine immunoréactive (TIR) dans le sang à quelques jours de vie. En effet, cette protéine est plus abondante chez les nouveau-nés présentant une insuffisance pancréatique. Une recherche des mutations les plus fréquentes du gène *CFTR* est ensuite effectuée pour distinguer ceux qui sont atteints spécifiquement de la mucoviscidose (Figure 16). Le test de la sueur, historiquement réalisé pour dépister la mucoviscidose (§2.2 p41), est toujours utilisé pour confirmer le diagnostic.

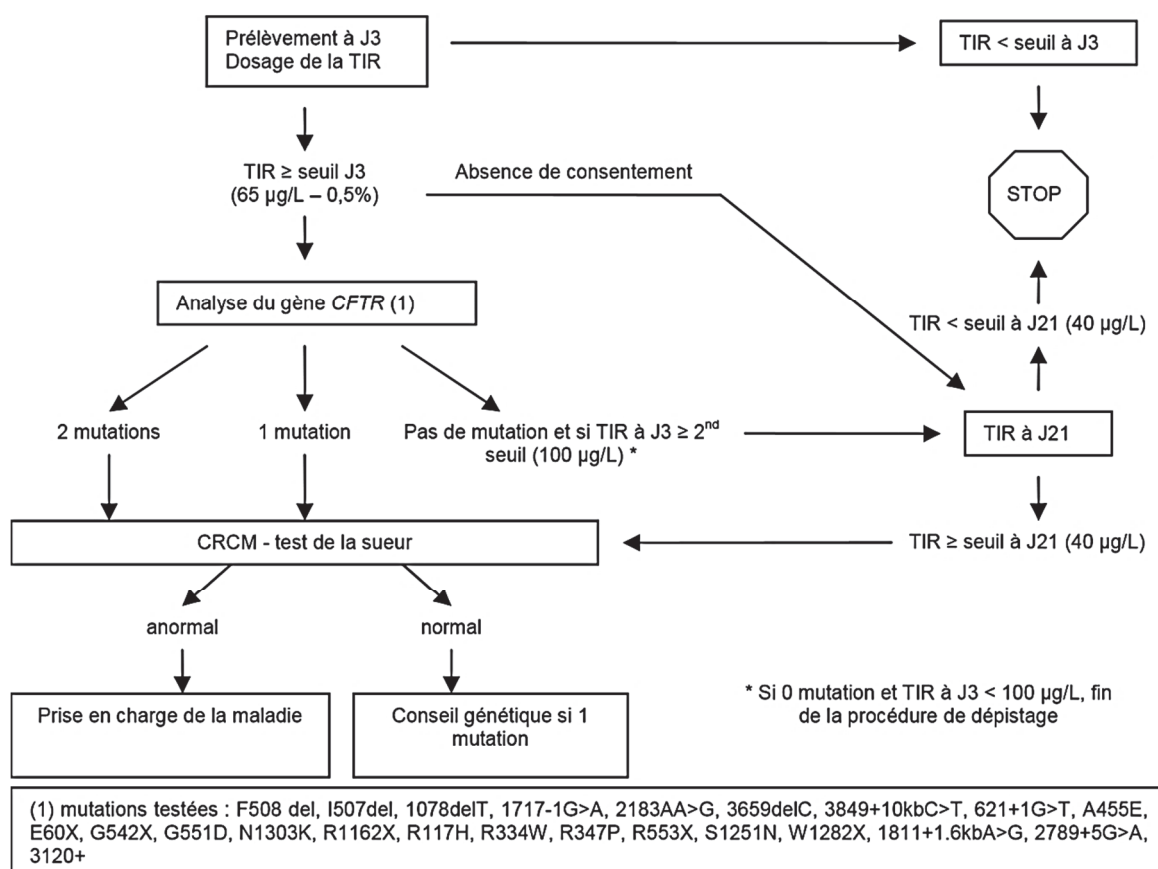


Figure 16. Algorithme du dépistage de la mucoviscidose
(Hautes Autorités de Santé, 2009)

2.4.5 Génotypes responsables de la mucoviscidose

Les génotypes les plus fréquents dans la population mucoviscidosique française sont constitués d'au moins un allèle delF508 (Tableau 4). Le génotype homozygote pour cette mutation est le plus représenté, à hauteur de 42,3%. Il existe un grand nombre de combinaisons possibles des différentes mutations du gène *CFTR*, qui sont par conséquent peu représentées dans la population.

Génotype	Fréquence (%)
F508del / F508del	42.3 %
F508del / G542X	3.2 %
F508del / N1303K	2.3 %
F508del / 2789+5G->A	1.6 %
F508del / 1717-1G->A	1.5 %
F508del / R117H	1.5 %
F508del / R553X	1.1 %
F508del / G551D	1.0 %

Tableau 4. Fréquence des génotypes responsables de la mucoviscidose
Seuls les génotypes d'une fréquence supérieure à 1% figurent dans ce tableau.
D'après Le Registre français de la mucoviscidose 2012

2.4.6 Phénotypes caractéristiques de la mucoviscidose

2.4.6.1 Corrélation génotype-phénotype

La fonctionnalité résiduelle du canal CFTR conditionne la sévérité de la maladie (Cohn et al., 1998). Les génotypes présentant deux mutations conduisant à l'absence ou la quasi-absence de la protéine CFTR à la membrane (classe I, II), à l'altération de sa régulation (classe III), ou à son instabilité (classe VI) sont généralement associés à un phénotype sévère. Ceux qui contiennent au moins une mutation conduisant à la présence d'une faible quantité de la protéine CFTR fonctionnelle à la membrane (classes IV et V) donnent souvent lieu à un phénotype modéré (Prickett and Jain, 2013) (Haardt et al., 1999). Le projet CFTR2, *Clinical and Functional Translation of CFTR*, est une base de données actualisée tous les ans, qui met à disposition des corrélations génotype - fonction du CFTR - phénotype pour près de 200 mutations, correspondant à environ 90% des situations cliniques (<http://www.cftr2.org/>).

Cependant, le rôle de l'environnement est à prendre en considération. En effet, les manifestations cliniques et l'évolution de la maladie sont très variables d'un patient à l'autre, et ceci même si les patients présentent les mêmes mutations. Des études sont actuellement en cours pour identifier des gènes modificateurs afin de pouvoir mieux prédire la sévérité de la maladie et ainsi adapter la prise en charge (Gallati, 2014).

2.4.6.2 Les différents organes atteints

La protéine CFTR, altérée chez les patients atteints de mucoviscidose, est située au niveau des cellules épithéliales de l'organisme. L'épithélium est un tissu de « revêtement » et forme notamment la peau, mais aussi les muqueuses, ou encore les glandes. La déficience en protéine CFTR se répercute ainsi sur plusieurs organes (Figure 17). Le mucus épais et visqueux, caractéristique de la mucoviscidose (§2.3.2.4 p46), obstrue notamment les différents conduits.

85% des patients présentent une insuffisance pancréatique exocrine. Les enzymes pancréatiques, indispensables à l'assimilation des nutriments, ne sont plus déversées dans les intestins. Ceci entraîne une malabsorption des glucides, des graisses, et des protéines, mais aussi des vitamines liposolubles (A, D, E et K). Celles-ci sont notamment impliquées dans l'immunité (vitA, D), la capacité à détoxifier les radicaux libres libérés lors d'infections (vitE), ou encore le métabolisme osseux (D, K).

Chez 5% des patients, les canaux biliaires sont également obstrués, perturbant le fonctionnement du foie et de la digestion. 10 à 15% des nouveau-nés présentent un iléus méconial, c'est-à-dire un épais bouchon qui obstrue les intestins et nécessite une intervention chirurgicale. 10 à 20% des patients peuvent également présenter le syndrome d'obstruction intestinale distale.

Les organes reproducteurs sont également atteints : chez les hommes, l'absence de canaux déférents rend stérile 95% d'entre eux, chez les femmes, la glaire cervicale est plus épaisse et rend difficile le cheminement des spermatozoïdes, entraînant une hypofertilité.

Le « baiser salé » est expliqué par un mauvais fonctionnement des glandes sudoripares qui conduit à une perte excessive de sel dans la sueur (§2.3.2.2 p44 et §2.3.2.4.2 p47).

L'âge d'apparition des symptômes et la sévérité de l'évolution de la maladie sont très différents d'un patient à l'autre, ce qui génère une grande diversité d'expressions cliniques. Par ailleurs, avec l'âge, des complications métaboliques comme le diabète, l'ostéoporose ou l'insuffisance rénale peuvent survenir. Cependant, l'atteinte respiratoire conditionne généralement le pronostic vital.

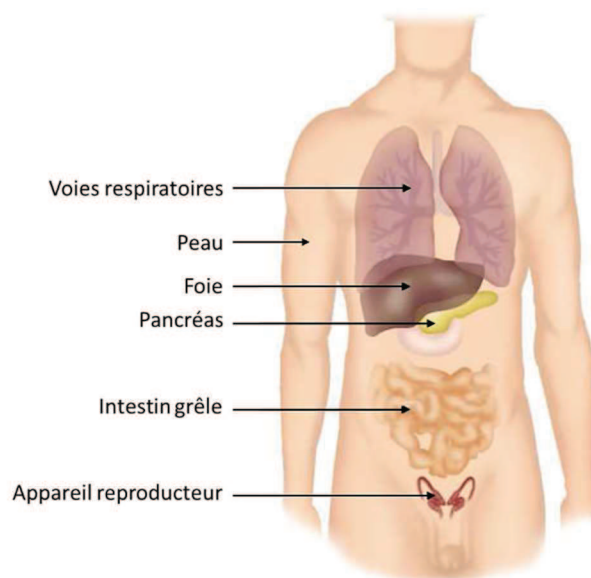


Figure 17. Les différents organes atteints chez les patients mucoviscidosiques

2.4.6.3 L'atteinte respiratoire

L'épithélium respiratoire s'étend des cavités nasales aux alvéoles, en passant par la trachée, les bronches et les bronchioles (Figure 18). Sa composition cellulaire est différente tout au long du parcours de l'air. Les alvéoles sont caractérisées par une paroi très fine, permettant les échanges gazeux et l'assimilation de l'oxygène nécessaire à l'organisme. L'air est purifié en amont des alvéoles et dès son entrée dans le tractus respiratoire, grâce au phénomène de clairance mucociliaire. Ce dernier est assuré par les cellules caliciformes et les cellules ciliées. Les cellules caliciformes

participent à la production du mucus, tandis que le battement coordonné des cils génère un flux directionnel permettant l'évacuation du mucus vers le carrefour aéro-digestif (Figure 19 A). Le mucus est une substance composée à 95% d'eau et d'électrolytes, il contient également des protéases et anti-protéases, des oxydants et anti-oxydants, des anticorps et des antibiotiques (Wine, 1999) qui permettent d'inactiver ou de détruire les agents pathogènes inhalés.

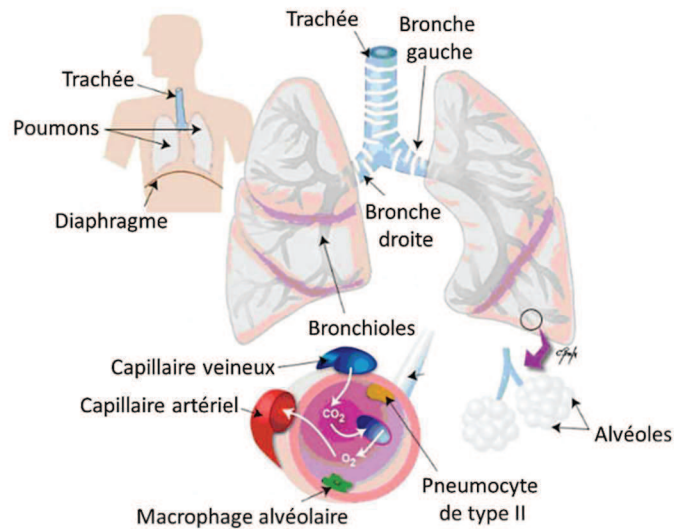


Figure 18. Schéma général du tractus respiratoire

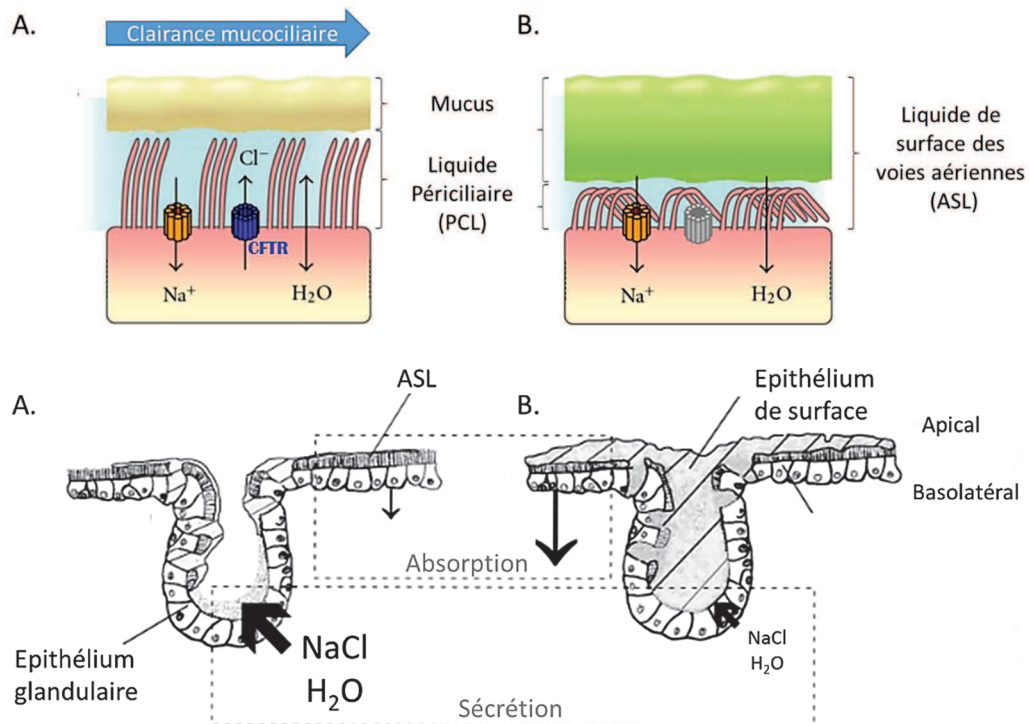


Figure 19. Epithelia glandulaire et de surface
A. chez le sujet sain ; B. chez le patient mucoviscidose
Adapté de (Reeves et al., 2012) et (Kunzelmann, 2001)

Chez les patients atteints de mucoviscidose, le mucus n'est pas suffisamment hydraté, ce qui le rend épais et visqueux. Il est alors difficilement évacué par les cils vibratiles (Figure 19 B). Ceci a deux conséquences majeures : l'obstruction partielle ou totale des bronchioles, rendant difficile le passage de l'air, et la colonisation des poumons par les bactéries opportunistes, comme *Staphylococcus aureus* ou encore *Pseudomonas aeruginosa*. En outre, une densité bactérienne trop importante engendre la formation de biofilms (Hoiby et al., 2011), particulièrement résistants aux antibiotiques ainsi qu'à la phagocytose. Cette colonisation, par ailleurs favorisée par la diminution des propriétés antibactériennes du mucus des patients (§2.3.2.4.1 p47), engendre une inflammation pulmonaire chronique. Les polynucléaires neutrophiles, recrutés habituellement sur le site d'une infection pour contribuer à son éradication, sont ici incapables de jouer leur rôle. A l'inverse, leurs filets d'ADN utilisés pour emprisonner les bactéries, aussi appelés NET pour *Neutrophil Extracellular Trap*, augmentent la viscosité du mucus. En outre, un excès de production de radicaux libres et de sécrétion de protéases entraîne un déséquilibre protéases/anti-protéases, hautement délétère pour le tissu respiratoire, et conduit progressivement à sa dégradation. La régénération des épithélia semble également perturbée, conduisant à leur remodelage et à la diminution de la proportion de cellules ciliées. L'atteinte pulmonaire constitue ainsi une succession d'événements (Figure 20) qui font tous l'objet d'une recherche active.

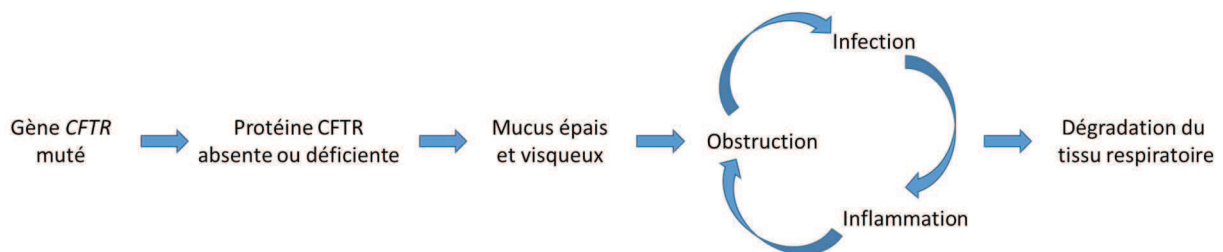


Figure 20. Conséquences phénotypiques de la mucoviscidose au niveau respiratoire

2.5 Les traitements de la mucoviscidose

2.5.1 La « pipeline »

La « pipeline » dresse la liste des traitements et des approches thérapeutiques actuellement en essai clinique ou déjà disponibles auprès des patients (Figure 21). Elle est mise à jour régulièrement par l'association américaine de lutte contre la mucoviscidose *Cystic Fibrosis Foundation* ou CFF.



Figure 21. Extrait de la « pipeline » créée par la CFF (octobre 2015)
D'après <http://www.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/>

2.5.2 Les traitements actuels

Les traitements actuels visent essentiellement les symptômes des deux atteintes vitales de la mucoviscidose : respiratoire et digestive. Grâce à une alimentation équilibrée, hypercalorique, riche en sel et complétementée par des vitamines et des extraits pancréatiques gastrorésistants (Créon®), l'insuffisance digestive est compensée (§2.4.6.2 p53). Il est très important d'avoir un bon apport calorique pour fournir l'énergie nécessaire à la respiration mais aussi à la lutte contre les pathogènes. Lorsque l'état respiratoire s'aggrave, les médecins ont recours à des compléments nutritionnels administrés par voie orale ou par nutrition entérale grâce à une sonde nasogastrique ou une gastrostomie.

L'atteinte respiratoire est traitée quotidiennement par des séances de kinésithérapie respiratoire, aidée par les activités sportives, et par des aérosols de fluidifiants bronchiques ou d'antibiotiques. Le drainage bronchique permet de ventiler le poumon et d'évacuer le mucus, afin d'aider les cils vibratiles peu efficaces. Commercialisé en France en 1994, le premier médicament spécifique de la mucoviscidose est un fluidifiant bronchique connu sous le nom de rhDNase (Pulmozyme®). Il s'agit d'une DNase recombinante humaine qui dégrade l'ADN extracellulaire (§2.4.6.3 p54). Parmi les fluidifiants bronchiques, il existe également le sérum salé hypertonique, qui crée un appel d'eau hors de la cellule et réhydrate ainsi le mucus. Les antibiotiques inhalés, tobramycine (Tobi®) et colistine (Colymicine®) permettent une action *in situ* au niveau du site de l'infection et sont moins toxiques que les antibiotiques administrés par voie parentérale. Toutefois, lorsque l'état respiratoire se dégrade, des cures d'antibiotiques intraveineuses sont nécessaires. A un stade plus avancé de la maladie, les patients peuvent avoir recours à l'oxygénothérapie, ou encore à la transplantation pulmonaire.

Pris dans leur globalité, ces traitements sont lourds, ce qui pourrait expliquer une adhésion thérapeutique et une observance non optimale, évaluée à 50%, allant de 30 à 70% selon les traitements. Des recherches visent également à améliorer le conditionnement des médicaments de manière à augmenter leur facilité de prise et donc leur efficacité. La réduction du temps de

nébulisation, l'optimisation des appareils ainsi que la disponibilité depuis peu des équivalents aérosols en poudre (Tobi Podhaler® et Colobreathe®) en sont des exemples.

2.5.3 Les traitements en cours de recherche

2.5.3.1 Introduction

La recherche est un continuum qui va de la recherche fondamentale à la recherche clinique, en passant par la recherche translationnelle. Les thématiques de recherche liées à la mucoviscidose sont aussi nombreuses que les causes et conséquences de cette maladie. Elles concernent le traitement de l'origine de la maladie avec la thérapie génique, protéique ou encore cellulaire, mais aussi le traitement des conséquences avec des études concernant les infections ou encore l'inflammation (Figure 22). Des recherches sont également en cours afin d'améliorer la compréhension de la maladie, mais aussi les méthodes de transplantation d'organe. La principale cause de mortalité et de morbidité étant l'atteinte broncho-pulmonaire, de nombreuses recherches se focalisent sur cet aspect, et c'est aussi la raison pour laquelle nous utilisons dans ce travail des cellules d'origine pulmonaire.

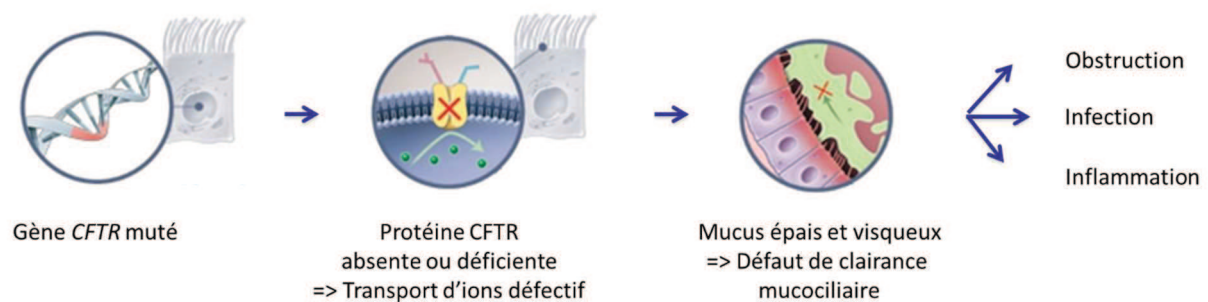


Figure 22. Les recherches sont pluridisciplinaires et axées sur l'origine et les conséquences phénotypiques de la mucoviscidose
Adapté de Roche

2.5.3.2 Traitements extracellulaires

De nombreuses recherches sont actuellement en cours concernant les traitements extracellulaires, à savoir l'obstruction, l'infection ou encore l'inflammation. S'ils traitent les symptômes et non l'origine de la maladie, ils n'en demeurent pas moins essentiels au maintien du capital respiratoire. Les exemples de traitements extracellulaires en cours de recherche cités ci-après sont non exhaustifs, mais illustrent la diversité des approches thérapeutiques envisagées.

2.5.3.2.1 Meveol

Des travaux ont précédemment montré que la lactoferrine et l'hypothiocyanite (OSCN⁻) (§2.3.2.4.1 p47) sont déficientes chez les patients atteints de mucoviscidose (Childers et al., 2007) (Moskwa et al., 2007) (Conner et al., 2007) (Rogan et al., 2004). La société Alaxia a ainsi combiné ces deux molécules antibactériennes pour donner le candidat médicament Meveol (Figure 23), qui a été

testé *in vitro* avec succès sur différentes souches, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, mais aussi *Burkholderia cepacia*. Des essais cliniques sont actuellement en cours dans le but d'obtenir une autorisation de mise sur le marché.

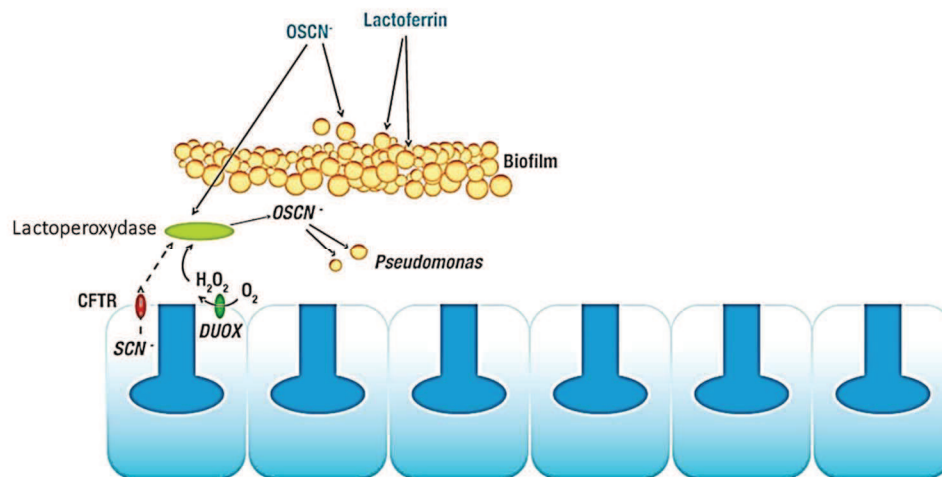


Figure 23. Action du Meveol sur les biofilms
<http://www.meveol.eu/>

2.5.3.2.2 Bactériophages

Les bactériophages, virus des bactéries, sont naturellement présents dans l'environnement. Comme tous les virus, ils utilisent la machinerie de leur hôte à leur profit, de manière à produire de nouveaux phages, entraînant rapidement l'éradication de la colonie. La phagothérapie, qui consiste à utiliser des bactériophages pour venir à bout des colonies bactériennes, date de 1919 (D'Herelle, 2007) et a été mise de côté lors de la découverte des antibiotiques. Cependant, les traitements antibiotiques multiples induisent une pression de sélection qui conduit à l'émergence de souches multirésistantes, amenant les scientifiques à reconsidérer les bactériophages comme potentiel thérapeutique. L'équipe de Debarbieux a récemment montré sur un modèle animal que les bactériophages sont capables de prévenir et de traiter les infections pulmonaires (Debarbieux et al., 2010) (Morello et al., 2011). Les recherches s'intensifient afin de répondre aux exigences de mise sur le marché. Il s'agit de mettre au point des cocktails efficaces de plusieurs clones de bactériophages, et également de mieux comprendre les mécanismes de co-évolution phage-bactérie. Dans les pays de l'Europe de l'Est, ils sont déjà utilisés pour venir à bout d'infections multirésistantes aux antibiotiques.

2.5.3.2.3 Bactérie marine *Pseudoalteromonas*

Le surnageant de culture de la bactérie marine *Pseudoalteromonas 3J6* sécrète une molécule qui ne présente pas d'activité bactéricide ni bactériostatique mais empêche la formation de biofilm (Simon, 2012). Cette caractéristique est particulièrement intéressante dans le cadre de la mucoviscidose, puisque les bactéries qui colonisent les voies respiratoires présentent souvent un phénotype mucoïde avec une surexpression d'alginate qui facilite la formation de biofilm. Cette communauté adhérente est particulièrement résistante aux antibiotiques. Cette découverte prometteuse doit encore être étudiée afin d'isoler l'agent anti-biofilm et le rendre conforme aux normes de mise sur le marché.

2.5.3.3 Thérapie protéique

La thérapie protéique vise à corriger les défauts de la protéine et à la rendre présente en quantité suffisante à la membrane cellulaire et fonctionnelle. On distingue ainsi deux types de molécules : les correcteurs et les activateurs. Les correcteurs permettent à la protéine CFTR de rejoindre la membrane plasmique et augmentent ainsi la quantité de CFTR à la membrane, tandis que les potentiateurs augmentent l'activité canal à ions chlorure de la protéine CFTR correctement insérée dans la membrane plasmique.

2.5.3.3.1 VX770

Depuis 2012 aux Etats-Unis et 2013 en Europe, la première molécule pharmaceutique ciblant le dysfonctionnement de la protéine CFTR est à disposition des patients. VX770, également connu sous le nom d'Ivacaftor et commercialisé sous le nom de Kalydeco® par Vertex Pharmaceuticals est un potentiateur ou activateur du CFTR. Il concernait à l'origine 2 à 4% des patients, porteurs d'au moins une mutation G551D, appartenant à la classe III (§2.4.2.2 p49). Il améliore le transport des ions en augmentant l'ouverture du canal, avec un mécanisme encore mal connu. Il a montré des améliorations significatives de différents paramètres cliniques, comme le VEMS, Volume Expiratoire Maximal par Seconde (+ 10%), mais aussi un gain de poids (+ 3kg,) et une diminution des exacerbations (Ramsey et al., 2011). Depuis peu, il est également accessible aux porteurs de 8 autres mutations « gating » G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P et G1349D.

2.5.3.3.2 VX809

Vertex a également développé un correcteur, VX809, encore appelé Lumacaftor, à destination des patients porteurs d'au moins une mutation delF508. La protéine CFTR est dans ce cas partiellement fonctionnelle mais retenue dans le réticulum endoplasmique puis dégradée (§2.4.3 p50). VX809 a montré sa capacité à adresser la protéine CFTR à la membrane (Ren et al., 2013), mais ne montre pas de bénéfice clinique seul. Cependant et de manière intéressante, de récentes études ont montré un effet positif de la combinaison du correcteur VX809 et du potentiateur VX770 sur le VEMS et le nombre d'exacerbations (Wainwright et al., 2015). La combinaison des deux molécules, nommée Orkambi™, a tout récemment obtenu son autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis, et elle est attendue pour la fin de l'année 2015 en Europe. Elle concerne cette fois-ci près de 42% des patients en France.

2.5.3.3.3 Miglustat

Le miglustat a donné beaucoup d'espoir à la communauté scientifique en 2006 puisque cette molécule, qui interagit avec la calnexine dans le processus de repliement de la protéine CFTR (§2.3.2.2 p44), a montré qu'elle était capable de corriger *in vitro* les effets de la mutation delF508 sur les patients homozygotes, et cela, dès 3-4 jours de traitement. Cet effet a été confirmé *in vivo* chez l'animal (Norez et al., 2009). Malheureusement, les essais cliniques qui ont suivi n'ont pas été concluants et n'ont pas encore permis à cette molécule d'aller plus loin dans le processus de validation thérapeutique. D'autres essais sont actuellement en cours.

2.5.3.3.4 Cytokératine 8

Des études ont montré que le niveau de cytokératine 8 (CK-8 ou K8) était augmenté dans les cellules HeLa CFTRd Δ F508 (Davezac et al., 2004). K8 interagit avec la protéine mutée au niveau de son domaine NBD1, contribuant à sa rétention dans le RE. Plusieurs approches sont développées pour empêcher cette interaction. (1) L'ajout de siRNA K8 conduit par exemple à la restauration de CFTR fonctionnel *in vitro* et *in vivo* (Colas et al., 2012). (2) De nouveaux composés chimiques sont par ailleurs capables d'inhiber l'interaction K8-NBD1 en se fixant sur le domaine NBD1 (Odolczyk et al., 2013). Enfin, (3) des études sont en cours pour délivrer des anticorps anti-K8 dans les cellules à l'aide de liposomes.

2.5.3.3.5 Ataluren

Le composé PTC124, encore nommé Ataluren, est une alternative à la gentamycine, antibiotique de la famille des aminoglycosides. Il constitue une approche thérapeutique visant les mutations de classe I, présentant un codon stop prématuré (§2.4.2.1.1 p49). Ce composé permet en effet de s'affranchir de ce codon pour générer une protéine entière potentiellement fonctionnelle selon un procédé dit de « translecture » (Welch et al., 2007). Alors que la gentamycine semble toxique et uniquement efficace sur la mutation Y122X (Sermet-Gaudelus et al., 2007), PTC124 est bien toléré et a fait l'objet d'une étude de classe III qui a révélé un bénéfice modeste sur la fonction respiratoire, sauf lorsque les patients n'étaient pas déjà traités avec la tobramycine (Kerem et al., 2014).

2.5.3.4 Thérapie génique

2.5.3.4.1 Introduction

La mucoviscidose est une maladie dite monogénique, causée par la présence de mutations au niveau d'un seul gène, le gène *CFTR* (§2.3.1 p42). Dès son clonage en 1989 (Kerem et al., 1989) (Riordan et al., 1989) (Rommens et al., 1989), les chercheurs ont donc commencé à travailler sur la thérapie génique, qui consiste à corriger le gène défectueux grâce à des techniques telles que les nucléases à doigt de zinc (Lee et al., 2012) ou à apporter une nouvelle copie du gène dans les cellules par l'intermédiaire de différents vecteurs. Cette dernière approche est particulièrement attrayante car elle offre potentiellement la possibilité de traiter toutes les mutations, quelle que soit leur classe ou leur fréquence dans la population mucoviscidosique.

4 ans après le clonage du gène *CFTR*, les premiers essais cliniques de thérapie génique ont été publiés (Zabner et al., 1993), (Crystal et al., 1994). 25 ans plus tard, plus d'une vingtaine ont été réalisés à l'aide de vecteurs viraux tels que l'adénovirus recombinant (rAd) (Bellon et al., 1997) (Harvey et al., 1999), (Perricone et al., 2001), l'adénovirus associé (AAV) (Martini et al., 2011), ou encore non viraux, comme les lipides cationiques (Caplen et al., 1995) (Ruiz et al., 2001) (Figure 24). Les cellules les plus impliquées dans le processus pathologique étant celles de l'épithélium bronchique et bronchiolaire, ce sont elles qui sont visées dans les protocoles thérapeutiques.

Les différents essais cliniques ainsi que leurs résultats ont été recensés sur ce site internet http://www.cfgenetherapy.org.uk/genetherapy/article/CF_Gene_Therapy_Clinical_Trials. La thérapie génique donne beaucoup d'espoir aux acteurs de la lutte contre la mucoviscidose, cependant, les essais cliniques ont révélé des difficultés que la communauté scientifique cherche encore aujourd'hui

à contourner, comme l'accessibilité des cellules épithéliales respiratoires, ou encore la dégradation des vecteurs par le système immunitaire de l'hôte. Il faut donc encore parfaire les vecteurs pour améliorer leur tolérance et leur efficacité.

Les vecteurs adénoviraux étant utilisés au cours de notre thèse, j'ai choisi d'en apporter une brève description dans ce chapitre.

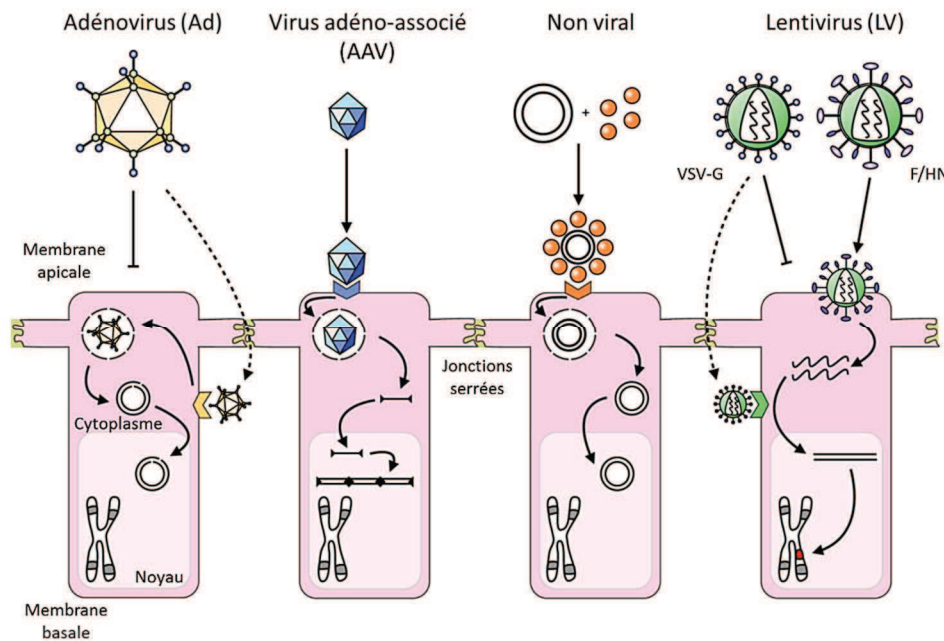


Figure 24. Les différents types de vecteurs utilisables en thérapie génique
Adapté de (Gill and Hyde, 2014)

2.5.3.4.2 Adénovirus et vecteurs adénoviraux

Les adénovirus sont une famille de virus non enveloppés, de 70 à 90 nm de diamètre. Ils sont capables d'infecter les cellules quiescentes et ont un tropisme pour l'appareil respiratoire, le tube digestif et les tissus oculaires. Ils sont constitués d'une capside protéique icosaédrique qui protège un cœur nucléoprotéique (Figure 25 A). Ces virus à ADN double brin ont un génome de 36 kb organisé en unités de transcription exprimées de manière séquentielle. Les adénovirus de sérotypes 2 et 5 du sous-groupe C sont les plus couramment utilisés en essais de thérapie génique.

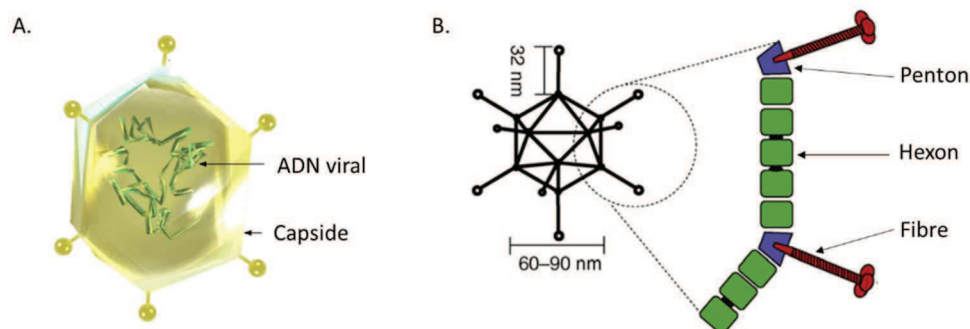


Figure 25. Représentation et schéma d'un adénovirus
A. <http://www.gene-delivery.ox.ac.uk> ; B. (Singh and Kostarelos, 2009)

Les protéines de la capsid, fibres et bases de penton (Figure 25 B), sont responsables de la pénétration de l'adénovirus dans les cellules cibles. Les fibres permettent en effet l'attachement du virus à la cellule sur un récepteur membranaire, nommé CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*) pour les Ad2 et Ad5. Ceci provoque un changement de conformation des bases de penton, qui exposent alors leur motif RDG (Arg-Gly-Asp), lequel interagit avec les intégrines cellulaires, conduisant à l'internalisation du virus par endocytose (Mathias et al., 1994) (Figure 26-1). L'adénovirus se retrouve ensuite dans l'endosome précoce, où il sera partiellement dégradé. Il s'ensuit une rupture de l'endosome par acidification, ce qui libère le complexe nucléoprotéique dans le cytoplasme (Figure 26-2). Les hexons, autres composants de la capsid, se fixent alors au complexe du pore nucléaire, permettant à l'ADN viral de pénétrer dans le noyau (Trotman et al., 2001). Ses gènes sont ensuite exprimés de manière extrachromosomique, c'est-à-dire sans intégration préalable dans le génome de la cellule hôte (Figure 26-3). Les gènes précoces (E1 à E4) codent des protéines régulatrices qui bloquent les mécanismes anti-viraux de la cellule hôte et préparent la réplication virale alors que les gènes tardifs (L1 à L5) codent des protéines de structure (Russell, 2000). Le cycle viral s'achève par l'encapsidation et la libération des virions par lyse cellulaire.

Les vecteurs adénoviraux sont des adénovirus génétiquement modifiés. Les vecteurs de première génération présentent en effet une délétion des gènes E1 et E3, les rendant défectifs pour la réplication, protégeant ainsi la cellule de la lyse et de la propagation du vecteur. La séquence du transgène a été insérée dans le génome du virus, ce qui permet son expression dans les cellules cibles.

Les vecteurs adénoviraux ont été les premiers testés en essai clinique, tout d'abord au niveau du nez, puis au niveau des poumons. Ils présentent l'avantage d'être non intégratifs, contrairement aux rétroviraux, cependant cela conduit à une expression instable et transitoire du transgène et implique des administrations répétées. L'efficacité a été montrée, mais elle décroît rapidement, jusqu'à ne plus obtenir de réponse dès la 3^{ème} administration. Ceci témoigne de leur élimination par les anticorps neutralisants. Par ailleurs, des réactions inflammatoires ont parfois été observées. Enfin, il est à noter que le risque de récupération de la fonction de réplication par recombinaison avec un adénovirus sauvage n'est pas nul.

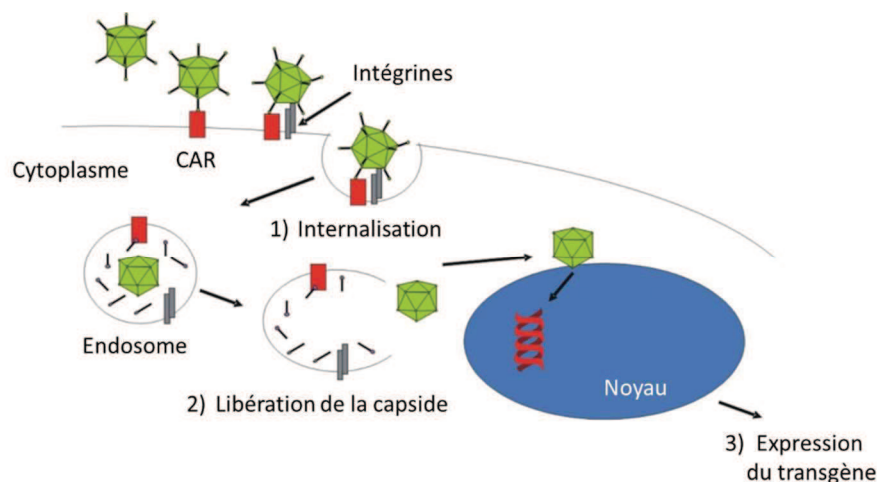


Figure 26. Du vecteur adénoviral à l'expression du transgène
Adapté de (Bryan E. Strauss and Eugenia, 2013)

2.5.3.4.3 Vecteurs non viraux

Les vecteurs non viraux sont généralement constitués de molécules d'ADN plasmidique complexées avec des lipides cationiques ou des polymères, donnant naissance aux lipoplexes ou aux polyplexes. Ils sont moins efficaces que les vecteurs viraux puisqu'ils sont dépourvus des signaux d'entrée cellulaire présents à la surface des virus et vecteurs viraux. Cependant, ils sont aussi moins immunogènes, donc peu ou pas inducteurs d'anticorps neutralisants, et par conséquent, leur efficacité, bien que moindre, est davantage maintenue au cours des administrations (Hyde et al., 2000), (Gill and Hyde, 2014). Un consortium réunissant des équipes des universités d'*Oxford*, *Edinburgh* et *Imperial College London* travaille depuis 2001 sur l'optimisation d'un lipide cationique, vecteur d'ADN plasmidique codant la protéine CFTR : pGM169/GL67A (Figure 27). GL67A est une co-formulation de lipide cationique GL67 (Genzyme Lipid 67), de DOPE (dioléoylphosphatidyléthanolamine) qui permet de faciliter l'échappement endosomal, ainsi que de DMPE-PEG5000 (1,2-Dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine polyéthylèneglycol) qui permet de stabiliser les formulations à des concentrations suffisantes pour l'aérosolisation (proportions respectives 1 : 2 : 0,05). L'une des particularités de ce vecteur est que l'ADN plasmidique d'intérêt est dépourvu de motifs CpG, généralement reconnus comme ADN étranger par la cellule et à l'origine d'une réaction inflammation tissulaire (Armstrong et al., 2014). Une étude clinique de phase 2b a débuté en 2012 sur une cohorte de 136 patients et consistait à administrer par aérosol, mensuellement et sur une durée d'un an, le vecteur de thérapie génique pGM169/GL67A. Les résultats, qui viennent tout juste d'être publiés (Alton et al., 2015), montrent une amélioration de la fonction respiratoire, mesurée par le paramètre VEMS, allant de + 3,7% à + 6,4% pour les patients présentant une fonction respiratoire dégradée. Ces résultats sont très encourageants et ouvrent la voie à de nouveaux essais où seront testées différentes doses et différentes fréquences d'inhalation afin d'être améliorés (<http://www.cfgenetherapy.org.uk>).

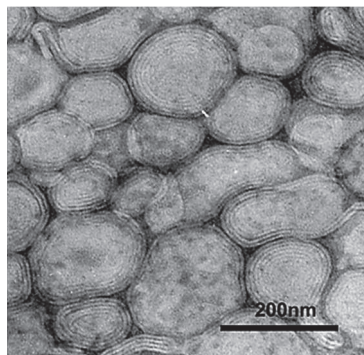


Figure 27. Image de microscopie électronique des liposomes GL67A
<http://www.genemedresearch.ox.ac.uk/ukcfgtc/product.html>

Par ailleurs, des études ont également été réalisées dans le but d'améliorer l'efficacité des lipides cationiques. Une formulation contenant un complexe arsenical a en effet montré des propriétés antibactériennes intéressantes, permettant de contribuer à l'éradication des bactéries contaminantes, et de favoriser ainsi l'efficacité du transfert de gène aux cellules cibles (Le Gall et al., 2013).

Notre travail de thèse propose une stratégie utilisant des vecteurs non viraux qui présenteraient l'avantage d'être également non synthétiques et potentiellement plus aptes à être tolérés par l'organisme. Les vésicules extracellulaires font en effet l'objet de nombreux travaux depuis quelques années et constituent une approche intéressante à explorer.

3 Les vésicules extracellulaires

3.1 Découverte des vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires sont évoquées dans la littérature depuis plus de 40 ans. Wolf met en évidence en 1967 la présence de particules riches en lipides provenant des plaquettes et purifiables par ultracentrifugation (Wolf, 1967). En 1975, Dalton décrit des microvésicules associées aux cellules épithéliales et aux lymphoblastes, qui ont la même structure que les vésicules présentes dans les corps multivésiculaires, ainsi que des particules présentes dans le sérum (Dalton, 1975).

Elles apparaissent ensuite de manière plus détaillée en 1981 (Trams et al., 1981). Cette équipe décrit des vésicules provenant de différents types cellulaires et ayant une activité 5' nucléotidase. Compte tenu de leur composition en phospholipides, essentiellement sphingomyéline et acides gras polyinsaturés, les auteurs pensent que ces vésicules proviennent de la membrane plasmique. Les images de microscopie électronique montrent des vésicules de 500 nm à 1 µm de diamètre, ainsi qu'une population de 40 nm de diamètre. Le terme d'exosome est proposé pour l'ensemble de ces vésicules, qui pourraient avoir un rôle physiologique.

En 1983, une équipe travaillant sur le recyclage du récepteur à la transferrine dans les réticulocytes découvre la possibilité de fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique (Figure 28), ayant pour effet de libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire (Harding et al., 1983; Harding et al., 1983; Harding et al., 1983). Il était jusqu'alors admis que les récepteurs à la transferrine étaient dégradés par les lysosomes lors de la maturation en érythrocyte. Cette découverte apporte donc une nouvelle dimension au recyclage intercellulaire. Par ailleurs, une autre équipe publie dans un même temps une étude mettant en évidence la présence de « microvésicules » ou « ectosomes » libérés par des réticulocytes et contenant le récepteur à la transferrine (Pan and Johnstone, 1983).

Les termes d'exosomes, microvésicules ou encore ectosomes sont dans un premier temps utilisés pour décrire les vésicules extracellulaires de manière confondue. Ils ont par la suite été précisés avec l'évolution des connaissances dans le domaine, mais ne sont pas encore utilisés de manière uniforme. Plusieurs noms sont retrouvés dans la littérature, faisant référence à leur taille (nanoparticules, microparticules, microvésicules...), à leur origine cellulaire ou tissulaire (oncosomes, prostasome...), ou encore simplement à leur présence en dehors de la cellule (ectosomes, exosomes, exovésicules...). La signification des termes employés doit ainsi être précisée et le protocole de purification vérifié afin d'éviter toute confusion.

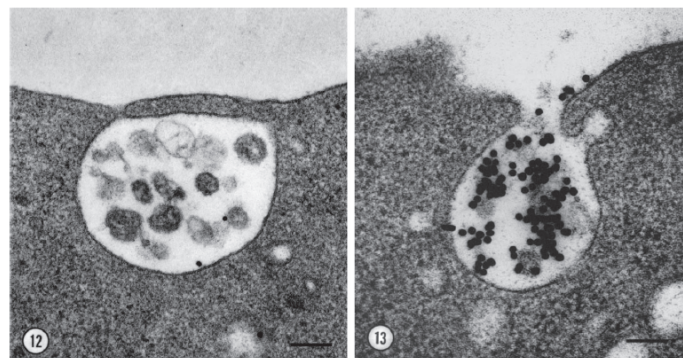


Figure 28. Découverte de l'exocytose des « endosomes multivésiculaires »
Les réticulocytes sont marqués avec de la transferrine couplée à des billes d'or colloïdal, barre d'échelle 200 nm.
D'après (Harding et al., 1983)

3.2 Biogenèse des EV

3.2.1 Les différentes catégories d'EV

Les vésicules extracellulaires (EV) se divisent en plusieurs catégories selon leur taille. On distingue les exosomes (Exo), de la taille d'un virus, environ 30 à 100 nm de diamètre, les microvésicules (MV), de l'ordre de grandeur de la bactérie soit 100 nm à 1 µm de diamètre, ou encore les corps apoptotiques, de 1 à 5 µm de diamètre (Figure 29). Ces derniers, de taille importante par rapport à la cellule, présentent également l'inconvénient de véhiculer des messages de mort cellulaire programmée et ne sont pas intéressants dans le cadre de notre étude.

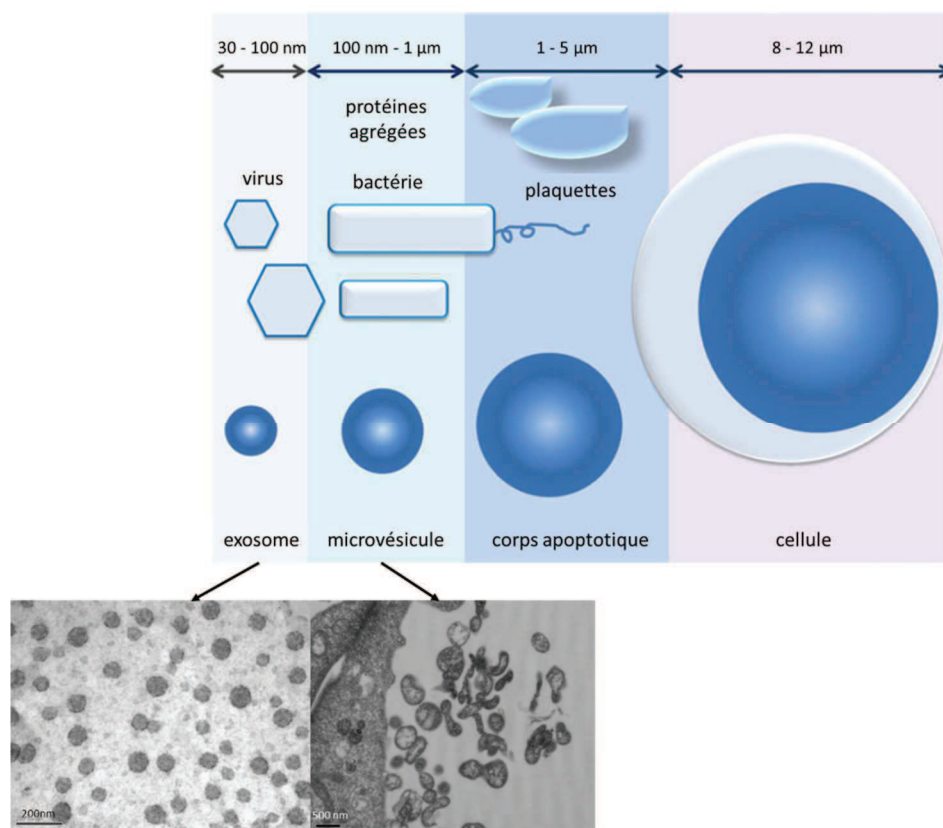


Figure 29. Ordre de grandeur des vésicules extracellulaires
Schéma adapté de (Gyorgy et al., 2011) - Clichés MET : G. Gonzalez et P. Boulanger

3.2.2 Voies de synthèse des EV

Nous avons vu que les EV se distinguent selon leur taille, elles se distinguent également selon leur mode de production. Les MV proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique tandis que les Exo sont issus de l'exocytose des corps multivésiculaires (Figure 30).

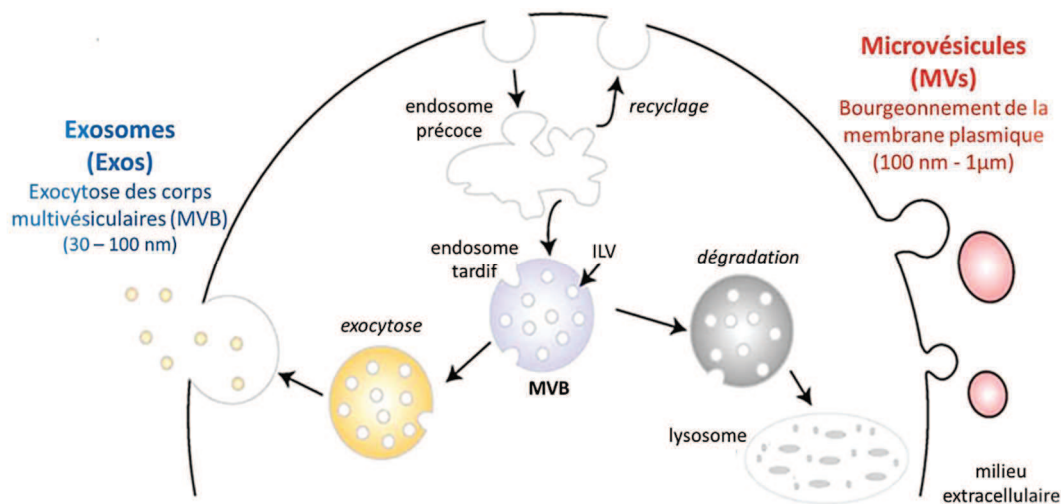


Figure 30. Voies de synthèse des vésicules extracellulaires
Schéma adapté de (Mathivanan et al., 2010)

3.2.2.1 Biogenèse des MV

Au repos, la membrane plasmique est caractérisée par une asymétrie lipidique contribuant à sa stabilité (Manno et al., 2002). En effet, le feuillet interne est principalement composé d'aminophospholipides, phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE), alors que le feuillet externe contient plutôt des sphingophospholipides, phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SM). Des protéines transmembranaires ATP-dépendantes, appelées translocases, permettent de maintenir cette asymétrie (Hugel et al., 2005). Elles transloquent les phospholipides d'un feuillet à l'autre contre leur gradient de concentration. Parmi les translocases, on distingue la flippase, responsable du maintien des aminophospholipides dans le feuillet interne, et la floppase, qui permet de maintenir les sphingophospholipides dans le feuillet externe (Figure 31). La scramblase, protéine transmembranaire permettant d'équilibrer les phospholipides dans les deux couches de la membrane, a une activité réduite en absence d'activation.

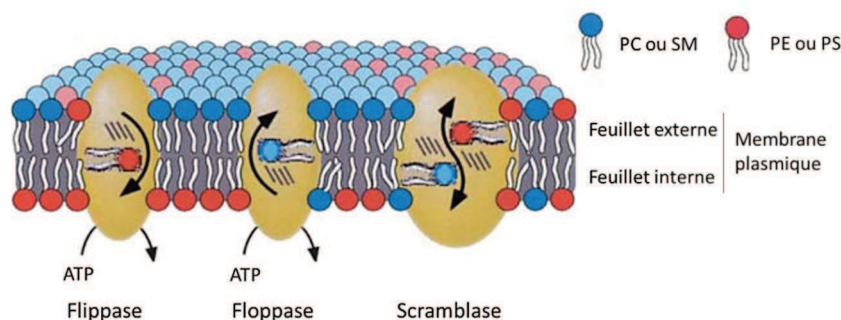


Figure 31. Les translocases maintiennent la stabilité de la membrane plasmique au repos
Adapté de (Zwaal et al., 2005)

Divers stimuli, tels qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, vont inhiber la flippase et activer la scramblase, ce qui aura pour conséquence de rompre l'asymétrie lipidique et de conduire à une surcharge lipidique transitoire au niveau du feuillet externe. Ce même stimuli est responsable de l'activation de la calpaïne, qui a pour conséquence de dégrader localement les

protéines du cytosquelette (Figure 32). La concomitance de ces deux événements conduit au bourgeonnement de la membrane plasmique et à la libération de microvésicules membranaires (Turturici et al., 2014).

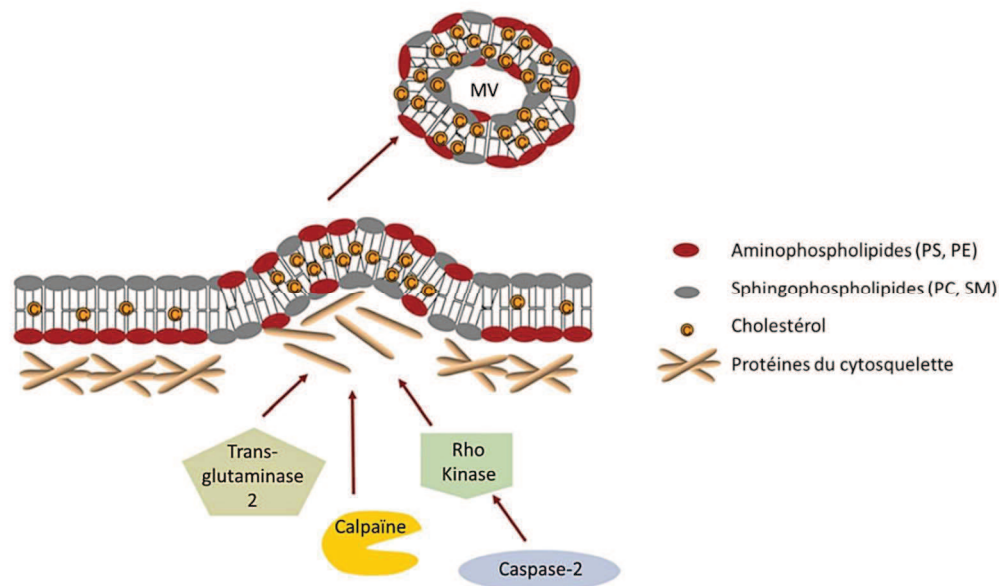


Figure 32. Formation des MV
Adapté de (Burger et al., 2013)

3.2.2.2 Biogenèse des Exo

Avant leur libération dans le milieu extracellulaire, les exosomes portent le nom d'ILV pour *IntraLuminal Vesicles* et sont contenus dans les corps multivésiculaires ou MVB pour *MultiVesicular Bodies*. Les MVB appartiennent à la voie endocytaire, constituée de compartiments membranaires très dynamiques. Ceux-ci sont impliqués dans l'internalisation de composants extracellulaires ou de protéines membranaires, mais aussi dans leur recyclage à la membrane plasmique, et/ou leur dégradation.

Une première invagination de la membrane plasmique conduit à la formation de vésicules d'endocytose, qui fusionnent avec les endosomes précoces. Ces derniers sont de véritables compartiments de tri, et permettent notamment à la cellule de recycler ses protéines membranaires selon ses besoins. Au cours de leur maturation, les endosomes précoces deviennent des endosomes tardifs. Durant ce processus, ils accumulent de petites vésicules nommées ILV. Celles-ci sont formées par invagination de la membrane des endosomes, séquestrant du contenu cytoplasmique selon un mécanisme encore mal compris. L'implication de protéines chaperonnes a été proposée (Geminard et al., 2004). Les endosomes tardifs acquièrent ainsi une morphologie multivésiculaire, qui donne leur nom aux MVB. Ces derniers ont ensuite deux destinées possibles : ils fusionnent avec les lysosomes entraînant la dégradation de leur contenu par les hydrolases lysosomales, ou bien ils fusionnent avec la membrane plasmique, libérant leur contenu dans le milieu extracellulaire donnant naissance aux exosomes. Il existe par conséquent différentes populations de MVB. Il est intéressant de noter que les MVB les plus riches en cholestérol ont davantage tendance à fusionner avec la membrane plasmique par le processus d'exocytose, alors que les MVB qui contiennent du LBPA (*Lyso(Bis)Phosphatidic Acid*) sont plutôt destinés à la fusion avec les lysosomes et donc à leur dégradation (Buschow et al., 2009) (Raposo and Stoorvogel, 2013).

Le mécanisme de formation des ILV le mieux décrit utilise la machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) qui fait intervenir quatre complexes protéiques majeurs ainsi que des protéines associées. Le signal d'entrée est l'ubiquitine présente sur les protéines adressées aux MVB. ESCRT-0, qui contient HRS (*Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate*), reconnaît et séquestre les protéines transmembranaires monoubiquitinylées, conduisant au recrutement d'ESCRT-I, qui contient Tsg-101. Ce dernier recrute à son tour ESCRT-II et participe à l'invagination de la membrane (Figure 33 a). ESCRT-II recrute ensuite ESCRT-III qui interagit avec le cargo ubiquitinylé pour entraîner son invagination en même temps que sa désubiquitinylation (Figure 33 b). Vps4 entre ensuite dans l'invagination pour désassembler les filaments d'ESCRT-III qui seront par la suite recyclés (Figure 33 c) (Raiborg and Stenmark, 2009).

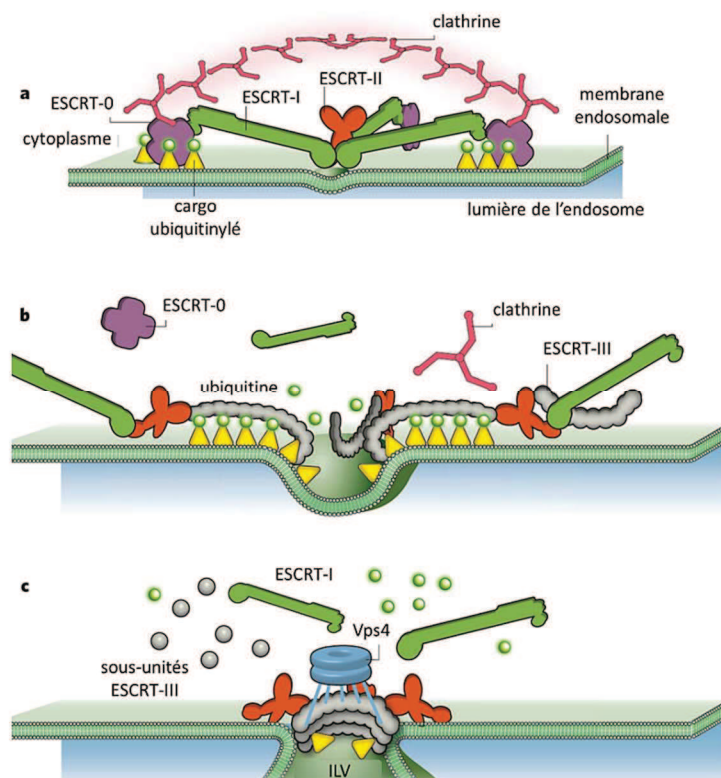


Figure 33. La machinerie ESCRT à l'origine des ILV
(Raiborg and Stenmark, 2009)

Ce processus ne semble pas être le seul conduisant à la formation des ILV. En effet, il a été montré que des cellules dépourvues des éléments clés de cette machinerie étaient tout de même capables de générer des MVB (Stuffers et al., 2009). Par ailleurs, une étude a montré qu'elles semblent plutôt destiner les ILV à la dégradation. En effet, l'ubiquitinylation du CMH II est nécessaire à sa dégradation par les lysosomes, contrairement à son incorporation dans les exosomes (Buschow et al., 2009).

La littérature évoque ainsi d'autres mécanismes de formation des ILV. Certains composants de la machinerie ESCRT peuvent tout de même être impliqués (Colombo et al., 2013). L'incorporation du récepteur à la transferrine en est un exemple, son incorporation n'est pas dépendante de l'ubiquitinylation, en revanche, elle nécessite l'intervention de la protéine accessoire ALIX (Geminard et al., 2004). Une équipe a récemment mis en évidence la participation d'un adaptateur cytosolique nommé synténine. Ce dernier se lierait aux protéines membranaires par l'intermédiaire de deux domaines PDZ d'une part, et à la protéine ALIX par l'intermédiaire de trois motifs LYPXnL d'autre part. ALIX s'associerait alors à ESCRT-III, responsable de la formation des ILV (Baietti et al., 2012). Par

ailleurs, l'activité héparanase semble également impliquée dans la formation des exosomes, et notamment l'incorporation de la tétraspanine CD63 (Baietti et al., 2012) (Roucourt et al., 2015). Deux enzymes du métabolisme lipidique sont également évoquées : l'activité sphingomyélinase, qui catalyse l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide (Trajkovic et al., 2008), ou encore la phospholipase D2 qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique (Laulagnier et al., 2004) (Ghossoub et al., 2014). Il est suggéré que ces produits induisent une courbure dans la membrane endosomique, entraînant son bourgeonnement. L'origine de formation des exosomes est ainsi très étudiée et tend à suggérer que plusieurs populations d'exosomes coexistent.

Le processus de fusion des MVB avec la membrane plasmique nécessite quant à lui l'intervention de protéines du cytosquelette, telles que l'actine ou encore les microtubules, mais aussi de moteurs moléculaires telles que la kinésine ou la myosine, d'interrupteurs moléculaires, comme les GTPases de la famille Rab et enfin de la machinerie de fusion impliquant les protéines SNARE. Une étude de RNA interférence a notamment montré qu'en absence des protéines Rab 27a et b, les cellules produisaient moins d'Exo. La taille des MVB était significativement augmentée en absence de Rab27a, témoignant de l'accumulation d'ILV. Par ailleurs, les MVB étaient localisés dans la région périnucléaire en absence de Rab27b, empêchant physiquement toute fusion à la membrane (Ostrowski et al., 2010).

3.2.2.3 Les divers stimuli

Plusieurs stimuli ont été recensés par Burger et al, selon les types cellulaires (Figure 34). Cette figure illustre la diversité des stimuli à l'origine de la production des EV, ainsi que la diversité des EV elles-mêmes et des messages transportés. Par ailleurs, d'autres stimuli entraînent également une libération d'exosomes, tels que le stress, provoqué par exemple par une incubation en présence de PBS, ou encore les attaques microbiennes. Ces vésicules transfèrent des signaux de stress qui sont toxiques pour les cellules cibles. Dans le but d'une application thérapeutique, il est donc important de travailler avec des cellules saines et non placées en condition de stress.

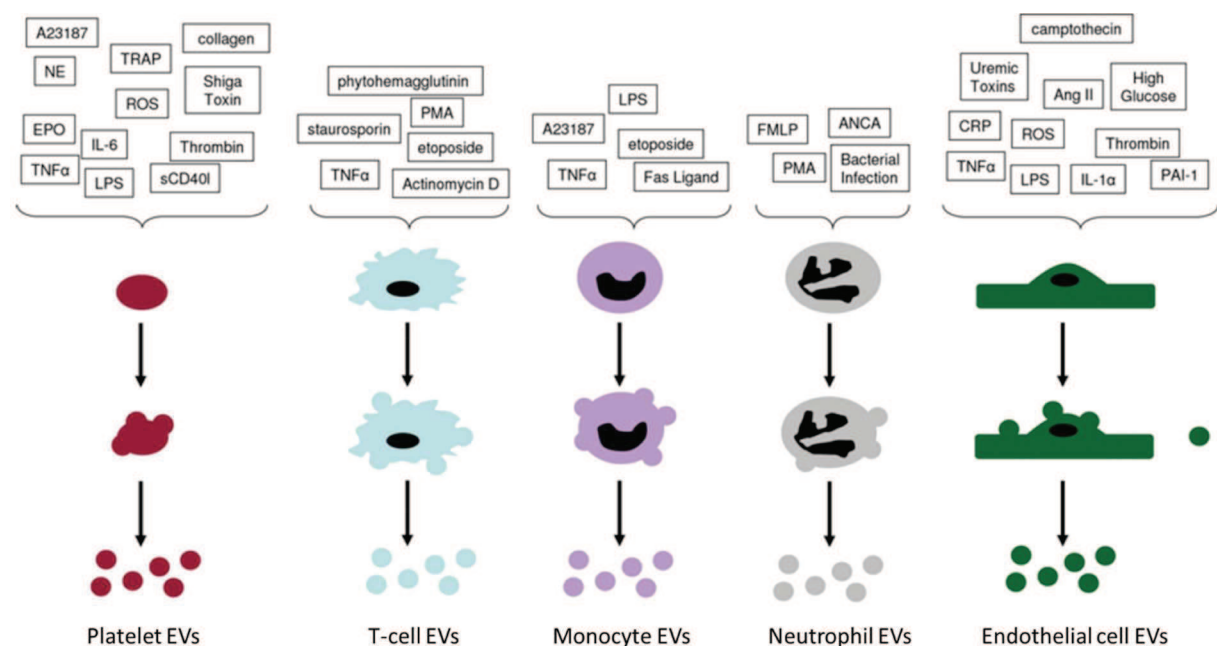


Figure 34. Les EV peuvent être produites via différents stimuli (Burger et al., 2013)

3.2.3 Composition lipidique, protéique et nucléique des EV

Les EV sont toutes caractérisées par de petites vésicules entourées d'une bicouche lipidique (Figure 35), dont la composition moléculaire diffère selon leur origine. Ainsi, la composition des Exo est proche de celle des endosomes, tandis que la composition des MV se rapproche davantage de celle de la membrane plasmique. Par ailleurs, la composition des EV dépend également du type cellulaire dont elles sont issues.

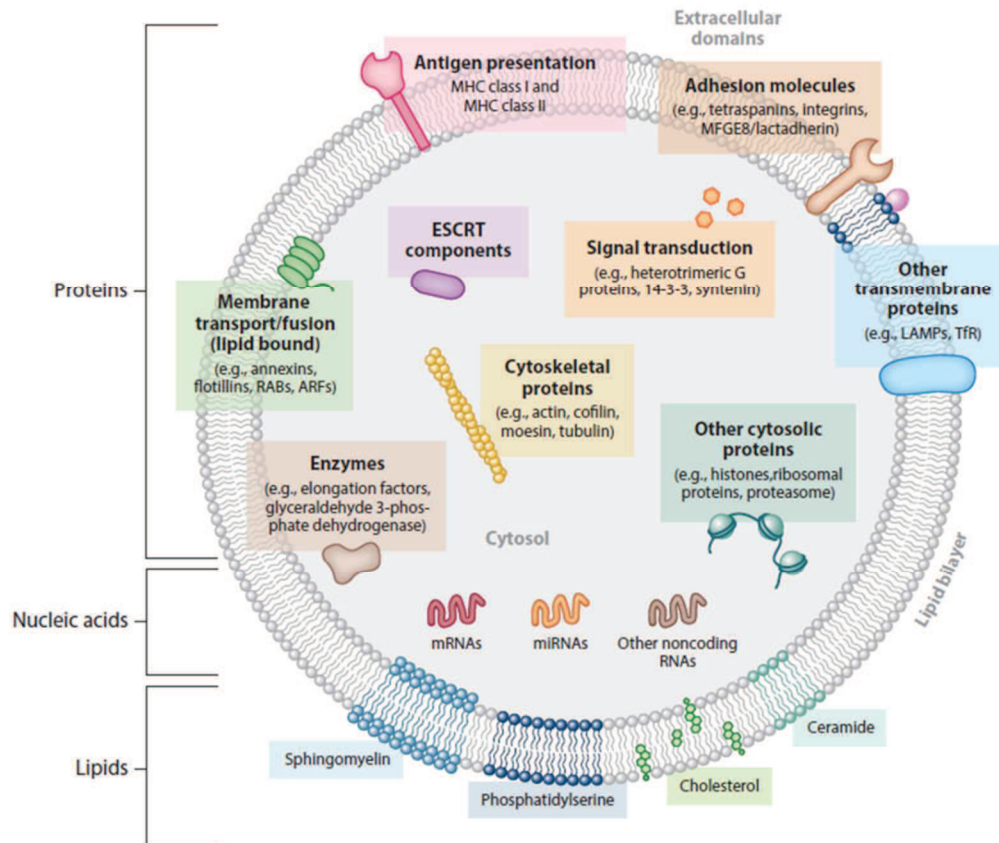


Figure 35. Composition générale des vésicules extracellulaires (Colombo et al., 2014)

Les MV et les Exo ont une composition lipidique similaire. Ils sont enrichis en sphingomyéline, cholestérol et céramides. La sphingomyéline et le cholestérol sont caractéristiques de domaines résistants aux détergents présents dans la membrane plasmique : les radeaux lipidiques encore appelés « lipid rafts ». Par ailleurs, des protéines associées aux rafts telles que les protéines à ancre GPI ou les flotillines ont été retrouvés dans les Exo. Il semblerait que ces domaines soient préférentiellement endocytés (Ikonen, 2001). L'asymétrie présente dans la membrane plasmique des cellules vivantes n'est pas conservée dans les EV, qui sont caractérisées par l'exposition de la PS sur leur feuillet externe. Ceci est certainement dû à l'absence de la flippase dans les EV (Hugel et al., 2005) (Colombo et al., 2014).

La composition en protéines des EV a tout d'abord été analysée grâce à des techniques utilisant des anticorps telles que le western blot et l'immunomicroscopie électronique, mais le développement des techniques d'analyse protéomique a par la suite permis l'identification à grande échelle de diverses protéines non prédominantes. Des bases de données regroupent les résultats des différentes études

réalisées ainsi que leur protocole de purification. Il s'agit d'un précieux outil pour améliorer la compréhension de la complexité des EV. La base de données ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>), créée en 2009 (Mathivanan and Simpson, 2009), recense à ce jour près de 10 000 protéines différentes retrouvées dans les Exo. Parmi celles-ci, certaines sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'elles sont généralement retrouvées dans tous les Exo et correspondent principalement aux protéines impliquées dans leur biogenèse, comme les tétraspanines Tsg-101 ou CD63, d'autres dépendent du type cellulaire et du statut physiopathologique de la cellule, ou encore des conditions de production. Les protéines du noyau, de la mitochondrie ou encore de l'appareil de Golgi ne sont pas retrouvées dans les Exo, ce qui confirme leur spécificité et les distingue des débris cellulaires (Keller et al., 2006). Par ailleurs, les Exo étant issus d'une double invagination de membrane, l'orientation des protéines transmembranaires est inchangée par rapport à la membrane plasmique. Concernant la composition protéique des MV, elle est dépendante de la cellule d'origine, bien que toutes les protéines ne soient pas retrouvées dans les MV. Une autre base de données regroupant les résultats des différents types de vésicules extracellulaires a également été créée. Elle est régulièrement mise à jour par les experts du domaine : Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org/>) (Kalra et al., 2012).

Depuis 2007, de nouvelles perspectives ont vu le jour avec la découverte d'ARNm et de miRNA dans les EV. De nombreuses études ont confirmé ce résultat, leur donnant ainsi également le statut de vecteurs d'information génétique. Par la suite, la présence de petits ARN non codants a été ajoutée à la liste des acides nucléiques véhiculés par les EV. Les ARNr 18S et 28S, quant à eux, sont généralement indétectables ou présents en très faible quantité, sauf en présence de corps apoptotiques (Crescitelli et al., 2013). Les bases de données recensent également les composants lipidiques et nucléiques des EV et sont en libre accès à la communauté scientifique.

Enfin, il est important de signaler que la modification des conditions de culture, comme l'hypoxie mimant le tissu tumoral, change la composition lipidique et protéique des EV. Ce paramètre doit être considéré dans l'optique thérapeutique de l'utilisation des EV.

3.3 Mécanismes de communication

Les EV sont porteuses de diverses molécules biologiques vectrices d'informations. La transmission de ces messages aux cellules cibles peut s'effectuer de plusieurs manières. Parfois, la seule liaison des EV aux cellules cibles suffit à induire des changements de l'état physiologique de la cellule cible (Figure 36 C). Le contenu des EV peut également être libéré en dehors de la cellule, où il pourra avoir une action sur la matrice extracellulaire (Figure 36 D). Dans la grande majorité des autres cas, le contenu des EV doit être transféré à l'intérieur de la cellule cible (Figure 36 A et B). Afin de libérer le contenu des vésicules dans le cytoplasme et permettre son utilisation par la cellule cible, il doit obligatoirement se produire une étape de fusion, soit directement avec la membrane plasmique, soit avec la membrane des compartiments endoplasmiques. Cette étape a été mise en évidence grâce à une expérience mettant en présence des Exo chargés en luciférine avec des cellules exprimant la luciférase. Une émission de bioluminescence a été observée, témoignant du passage de la luciférine dans le cytoplasme (Montecalvo et al., 2012).

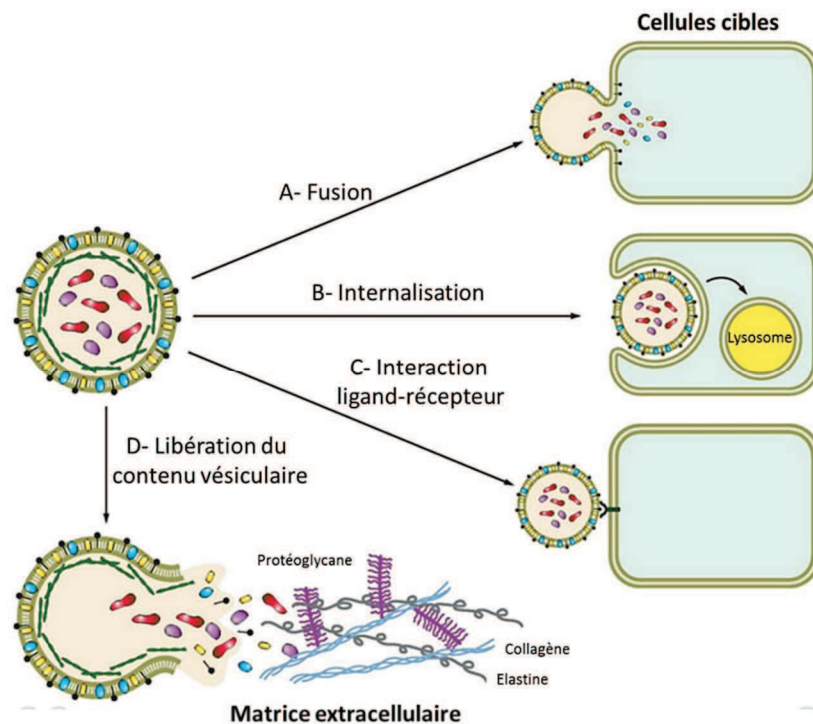


Figure 36. Les différents modes d'action des EV
 Adapté de (Turturici et al., 2014)

L'internalisation des EV a beaucoup été étudiée. Divers mécanismes sont décrits comme l'endocytose clathrine ou cavéoline dépendante ou indépendante, l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques, la macropinocytose, la phagocytose, ou encore la fusion avec la membrane plasmique (Figure 37). Ces différents modes d'entrée ne sont pas uniques au sein d'une population d'EV. Ceci explique qu'aucun inhibiteur utilisé ne permette de bloquer totalement l'entrée des EV dans les cellules.

Une étude a montré que l'entrée des EV était partiellement dépendante du ligand. En effet, un traitement à la protéinase K inhibe de manière significative mais incomplète l'internalisation des EV (Escrevente et al., 2011). Par ailleurs, la présence de phosphatidylsérine sur le feuillet externe des EV semble jouer un rôle dans l'internalisation des EV. Ce signal est reconnu par les macrophages pour internaliser les corps apoptotiques. En outre, il semblerait que le mécanisme d'entrée soit dépendant de la taille de l'EV, ainsi, les plus grosses vésicules ou les agrégats de petites vésicules entreraient plutôt par des phénomènes de phagocytose ou macropinocytose, tandis que les petites vésicules seraient internalisées par endocytose.

Par ailleurs, les tétraspanines, les intégrines et les immunoglobulines semblent également avoir un rôle dans le mécanisme d'internalisation. En effet, le traitement de cellules dendritiques avec des anticorps dirigés contre les tétraspanines CD81 ou CD9, les intégrines CD11a, α (CD51) and β 3 (CD61) ou encore la protéine de type immunoglobuline ICAM-1 entraînent une internalisation réduite des EV (Morelli et al., 2004).

Il a été suggéré que les EV sont internalisées par tous les types cellulaires. Cependant, il semblerait que certains types d'EV interagissent préférentiellement avec des types cellulaires définis, présentant un récepteur particulier par exemple. C'est le cas des EV présentes dans le lait maternel, qui peuvent être internalisées par les cellules dendritiques grâce à l'interaction entre DC-SIGN et MUC1, alors que les EV provenant d'une autre source et dépourvues de MUC1 ne sont pas capables d'entrer dans ces cellules (Naslund et al., 2014).

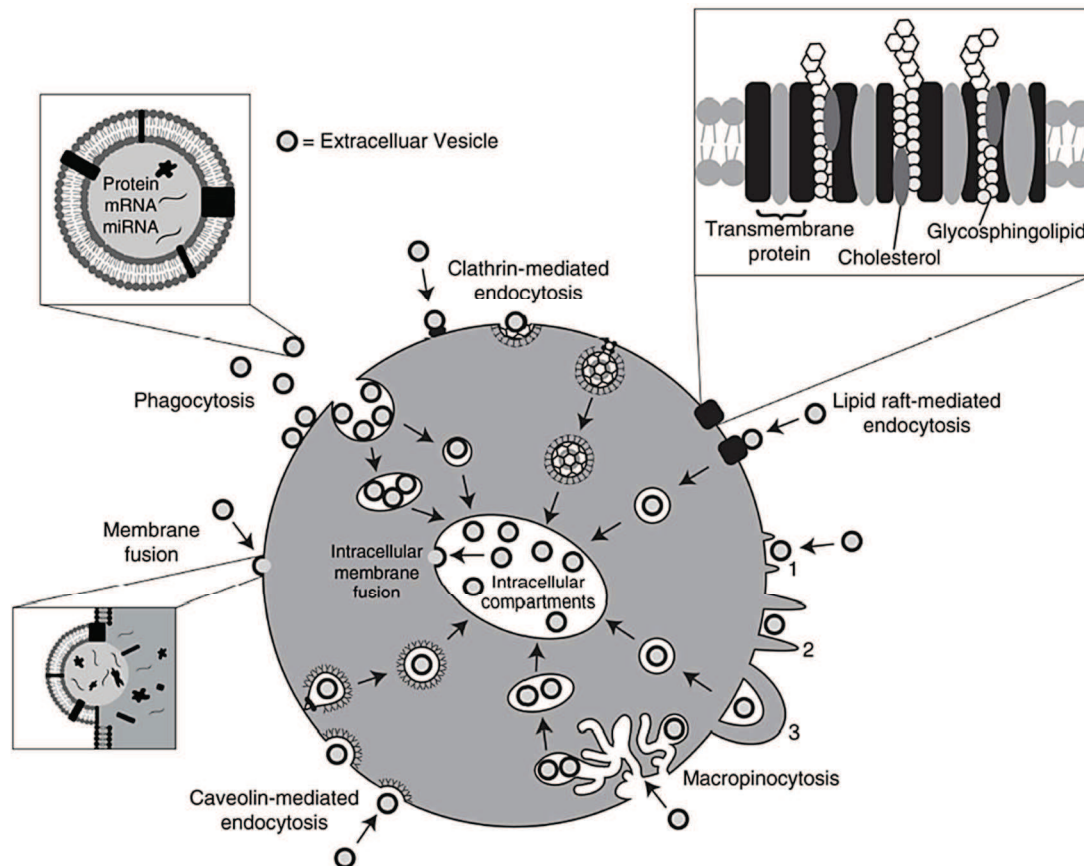


Figure 37. Mécanismes d'internalisation cellulaire des EV
(Mulcahy et al., 2014)

3.4 Fonctions des EV

3.4.1 Un nouvel outil de communication intercellulaire

Les EV étaient initialement perçues par la communauté scientifique comme des artefacts ou des débris cellulaires. Elles ont ensuite été considérées comme un mécanisme d'élimination de protéines obsolètes (Harding et al., 1983) (Pan and Johnstone, 1983). Aujourd'hui, il est communément admis qu'elles sont impliquées dans la communication intercellulaire, locale ou à distance. Elles complètent ainsi la communication médiée par des contacts cellule-cellule ou par des molécules sécrétées, telles que les neurotransmetteurs ou encore les hormones. La particularité des EV est qu'elles sont notamment capables de transférer du matériel biologique aux cellules cibles, tels que des ARN et des protéines (Figure 38), et ainsi de promouvoir des changements épigénétiques dans les cellules cibles. Le contenu et les fonctions des EV sont dépendants du type cellulaire d'origine.

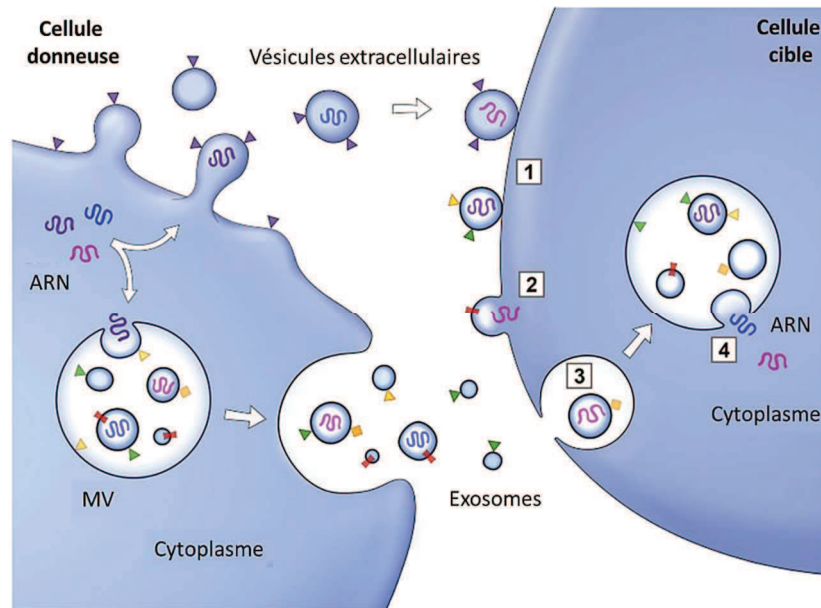


Figure 38. Transfert d'ARN et de protéine par l'intermédiaire des vésicules extracellulaires (Raposo and Stoorvogel, 2013)

Historiquement, il a été montré que les EV étaient libérées par les réticulocytes, les lymphocytes B et T, les plaquettes, les neurones, ou encore les cellules tumorales. Aujourd'hui, il est admis qu'elles sont libérées par tous les types cellulaires, et notamment les cellules épithéliales pulmonaires. Elles peuvent être libérées au sein d'un tissu et agir ainsi sur les cellules avoisinantes. Elles sont également retrouvées dans divers fluides corporels tels que le sang, l'urine, la salive, le lait maternel, le liquide amniotique, l'ascite, le liquide cérébro-spinal, la bile ou encore le sperme, leur permettant également d'agir à distance (Raposo and Stoorvogel, 2013) (Colombo et al., 2014) (De et al., 2015).

Elles sont impliquées dans des processus physiologiques, tels que la réponse immunitaire, la réparation des tissus, ou encore la coagulation sanguine, mais aussi dans des processus pathologiques tels que la tumorigenèse ou encore les troubles neurodégénératifs. Quatre domaines ont particulièrement été étudiés : la coagulation, l'inflammation, la régulation immune ou encore la cancérisation (Figure 39).

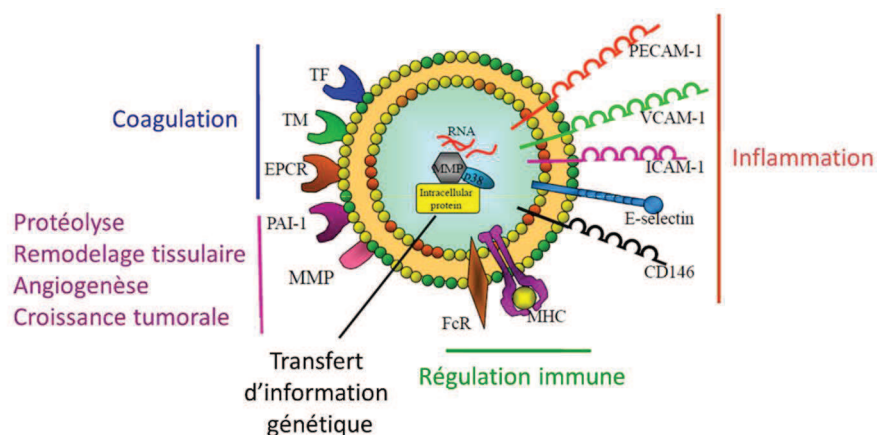


Figure 39. Relation structure / fonctions des EV

Adapté de (Leroy et al., 2010). TF : Tissue Factor, TM : ThromboModulin, EPCR : Endothelial Protein C Receptor, uPAR : urokinase Plasminogen Activator Receptor, uPA : urokinase Plasminogen Activator, FcR : Fc Receptor, MHC : Major Histocompatibility Complex, E-selectin : Endothelial selectin, ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1 : InterCellular, Vascular et Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, MMP : Matrix Metalloproteases.

3.4.2 Régulation de la réponse immunitaire et présentation d'antigènes

Les exosomes produits par les lymphocytes B présentent le CMH-I et le CMH-II à leur surface et ont ainsi un rôle dans la présentation d'antigène et la stimulation des lymphocytes T (Raposo et al., 1996). Les Exo peuvent activer les lymphocytes T soit directement par une présentation d'antigène, soit indirectement, en délivrant des peptides antigéniques aux cellules présentatrices d'antigène (Admyre et al., 2006) (Figure 40). Par ailleurs, les exosomes libérés par les lymphocytes NK contiennent des perforines et des granzymes qui ont des activités anti-tumorales *in vitro* et *in vivo* (Lugini et al., 2012). Les EV sont également impliquées dans des processus pro- et anti-inflammatoires. Une étude a notamment montré que les EV produites par les lymphocytes T induisent la production de TNF- α et d'IL-1 β par les monocytes (Scanu et al., 2008).

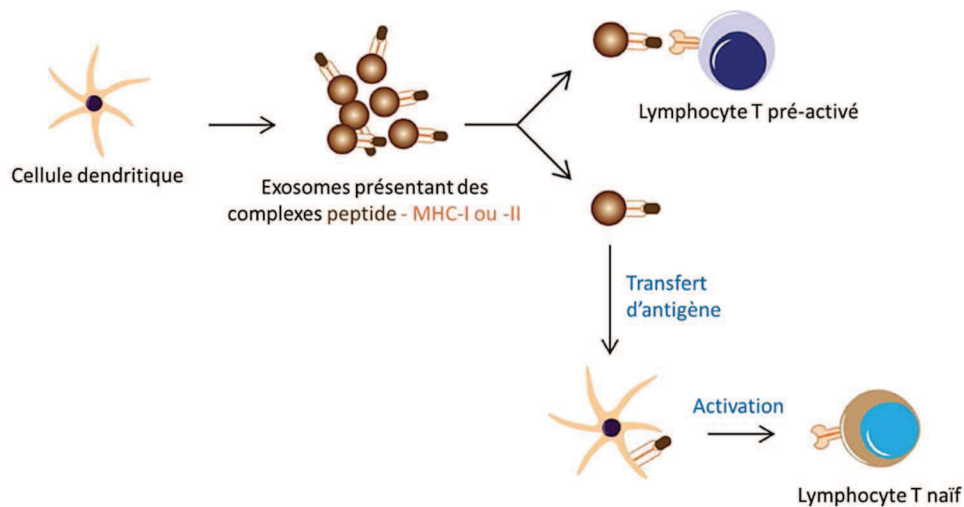


Figure 40. Les exosomes présentateurs d'antigènes
Adapté de (Zhang et al., 2014)

3.4.3 Communication neuronale

Les EV jouent également un rôle dans la communication neuronale, notamment entre les neurones et les oligodendrocytes, conduisant à la neuroprotection (Fruhbeis et al., 2013). Bien qu'impliqués dans le développement physiologique du système nerveux, les EV sont également associées à de nombreuses maladies neurodégénératives. Les Exo transportent notamment l'alpha-synucléine, une protéine mutée impliquée dans la maladie de Parkinson. Cette maladie est due à un défaut d'autophagie conduisant à l'accumulation de cette protéine mutée dans le cytoplasme des cellules. Les Exo participent donc à la propagation de la maladie (Danzer et al., 2012). Par ailleurs, ils sont également associés à la protéine prion PrP^{Sc} (Fevrier et al., 2004). Cette protéine anormalement repliée s'accumule dans le système nerveux central et conduit à des troubles neurodégénératifs conduisant à des maladies telles que la maladie de la vache folle (encéphalopathie spongiforme bovine), la tremblante du mouton ou leur homologue chez l'homme : la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Une étude a tout récemment montré que les deux mécanismes, ESCRT-dépendant et indépendant, sont impliqués dans la formation de ces Exo (Vilette et al., 2015).

3.4.4 Prolifération et différenciation cellulaire

3.4.4.1 *Processus physiologique impliquant les cellules souches*

Les cellules souches sont garantes de l'homéostasie tissulaire. La balance entre leur renouvellement et leur différenciation est régulée par leur microenvironnement, de même que leur phénotype. Il semblerait que les EV soient impliquées dans ces processus. Des études ont en effet montré que des cellules provenant de tissus endommagés produisent des MV qui sont capables de conduire à la différenciation de cellules souches et de promouvoir ainsi la réparation tissulaire (Ratajczak et al., 2006). Inversement, il a été montré que des MV sont capables d'induire la dédifférenciation de cellules pour renouveler le stock de cellules souches (Deregibus et al., 2010).

3.4.4.2 *Processus pathologique impliquant les cancers*

Les EV libérées par les cellules tumorales sont impliquées dans de nombreux processus conduisant à la progression des cancers. Le transfert de facteurs comme VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) aux cellules endothéliales promeut l'angiogenèse, processus nécessaire pour acheminer les nutriments et l'oxygène aux tumeurs solides et ainsi faciliter leur expansion (Figure 41 C). Il a été montré que ces vésicules éclatent en présence d'un pH bas comme c'est le cas dans le microenvironnement tumoral (Taraboletti et al., 2006). Par ailleurs, leur contenu en métalloprotéinases telles que MMP9 et MMP2, leur confère la possibilité de dégrader la matrice extracellulaire, contribuant à l'expansion de la tumeur, à la croissance tumorale (Ginestra et al., 1998) mais aussi à la dissémination des métastases (Figure 41 A). Enfin, elles interviennent également dans la survie de la tumeur de deux manières. (1) Elles permettent l'échappement du système immunitaire grâce à des propriétés immunosuppressives (Clayton et al., 2007). Les EV produites par les cellules cancéreuses exposent notamment le ligand Fas (Andreola et al., 2002), ce qui conduit à l'apoptose des cellules T et inhibe l'immunité adaptative (Figure 41 D). (2) Elles contribuent également à l'échappement de l'apoptose en exportant notamment la caspase-3, mais aussi à la résistance aux traitements en exportant les drogues (Figure 41 B). Une étude a par ailleurs montré l'implication des EV dans le transfert du transporteur ABC P-gp de cellules chimio-résistantes à des cellules chimio-sensibles, conférant à ces dernières une propriété de résistance aux médicaments (Bebawy et al., 2009).

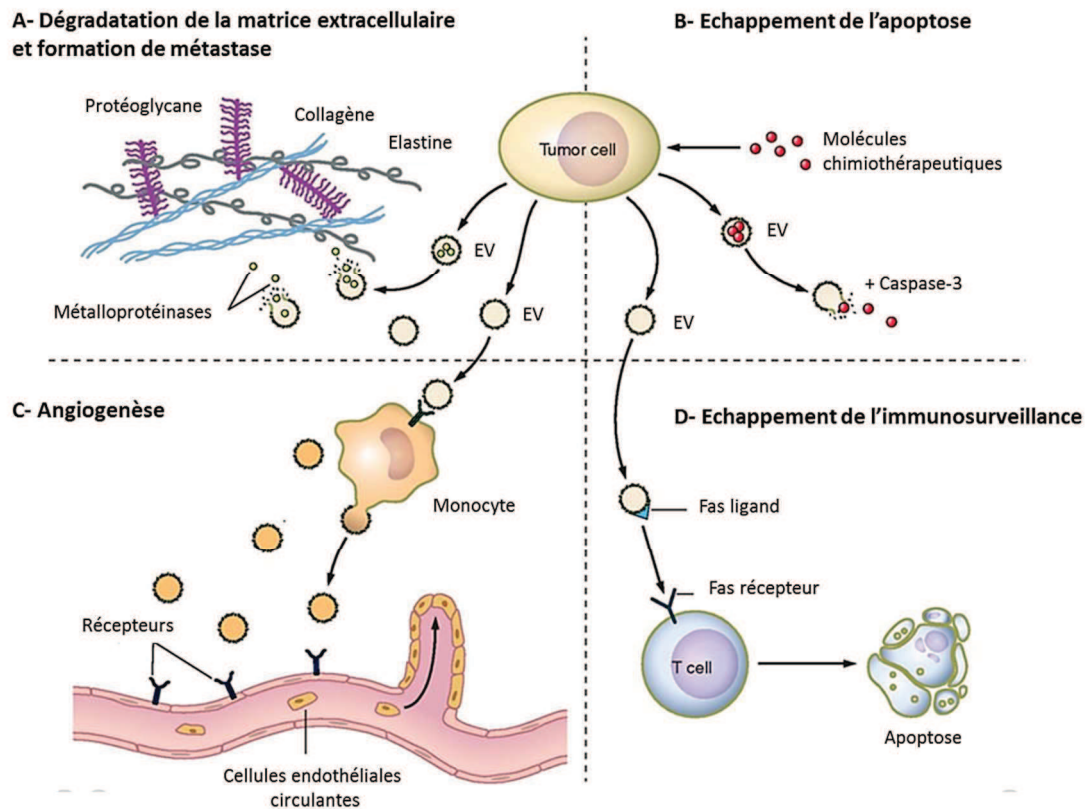


Figure 41. Les vésicules extracellulaires, médiateurs dans la progression du cancer
Adapté de (Turturici et al., 2014)

3.5 Applications des EV

L'implication des EV dans des processus pathologiques permet d'envisager de nouveaux tests pour le diagnostic de ces maladies. En effet, leur nombre et leur composition est spécifique de chaque maladie. Par ailleurs, la composition témoigne de changements moléculaires et peut ainsi indiquer le stade de la maladie ou encore témoigner de l'efficacité d'un traitement. Leur présence dans les liquides biologiques pourrait tout particulièrement faciliter la collecte des échantillons et ainsi l'établissement rapide et non invasif du diagnostic. La composition en acides nucléiques des EV présentes dans l'urine pourrait permettre par exemple de diagnostiquer les maladies du rein (Miranda et al., 2010). Avec des techniques de plus en plus sensibles, il serait alors possible de détecter certaines maladies de plus en plus tôt, comme les cancers par exemple, et ainsi optimiser les chances de guérison grâce à un traitement précoce.

L'implication des EV dans différents processus physiologiques permet également d'envisager ces vésicules comme nouvel agent thérapeutique, qui serait potentiellement faiblement immunogène et bien toléré par l'organisme. De manière intéressante, lorsqu'elles sont libérées par les cellules dendritiques, les EV peuvent avoir un rôle de présentateur d'antigène et permet ainsi de concevoir un vecteur d'immunothérapie (Zitvogel et al., 1998) (Wolfers et al., 2001). Ces vésicules sont appelées dexosomes, ou Dex, et sont actuellement en cours d'essai clinique (Pitt et al., 2014). La phase I a d'ores et déjà révélé que les exosomes sont effectivement bien tolérés par l'organisme (Escudier et al., 2005) (Morse et al., 2005). Leur rôle dans le transfert d'ARN permet également de les envisager comme de nouveaux vecteurs de biothérapie non génique.

B. Contexte scientifique et objectifs de la thèse

Depuis près de 20 ans, l'équipe d'Attilio Di Pietro est impliquée dans la biochimie des transporteurs ABC, et celle de Pierre Boulanger et Saw-See Hong dans le transfert de gènes et les biothérapies par vecteurs viraux ou pseudoviraux. Ces derniers ont notamment travaillé sur l'adénovirus recombinant comme vecteur du gène codant le canal CFTR. Plusieurs publications sont déjà parues sur le sujet, dans des journaux considérés comme des références dans le domaine.

Dans un premier temps, ils ont développé un vecteur adénoviral de sérotype 5 modifié génétiquement de manière à exprimer la protéine de fusion GFP-CFTR (Ad5-GFP-CFTR). Ils ont travaillé *in vitro* sur des lignées cellulaires épithéliales pulmonaires, MM39 (CFTRwt) et CF-KM4 (CFTR Δ F508), ainsi que *ex vivo* dans des modèles d'épithélia humains reconstitués à partir de cellules primaires provenant d'un donneur sain (HAEC, *human airway epithelial cells*) et d'un patient homozygote Δ F508 (CF-HAEC) ; travail réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Joseph Zabner, *Department of Internal Medicine*, Université d'Iowa. Ils ont montré que la protéine de fusion sauvage était stable et correctement adressée à la membrane plasmique des cellules infectées par Ad5-GFP-CFTRwt, alors que la protéine mutée était séquestrée dans le cytoplasme des cellules infectées par Ad5-GFP-CFTR Δ F508 (Figure 42). Par ailleurs, les tests de fonctionnalité de la protéine sauvage dans les cellules cibles de l'Ad5-GFP-CFTRwt ont révélé une activité de canal à ions chlorure similaire à celle de la protéine CFTR non étiquetée. Ils ont ainsi été les premiers à mettre au point un outil capable de suivre la protéine CFTR dans des cellules humaines non seulement par sa fonctionnalité en tant que canal à ions chlorure, mais aussi par les différentes techniques utilisant la fluorescence grâce à l'étiquette GFP (Granio et al., 2007).

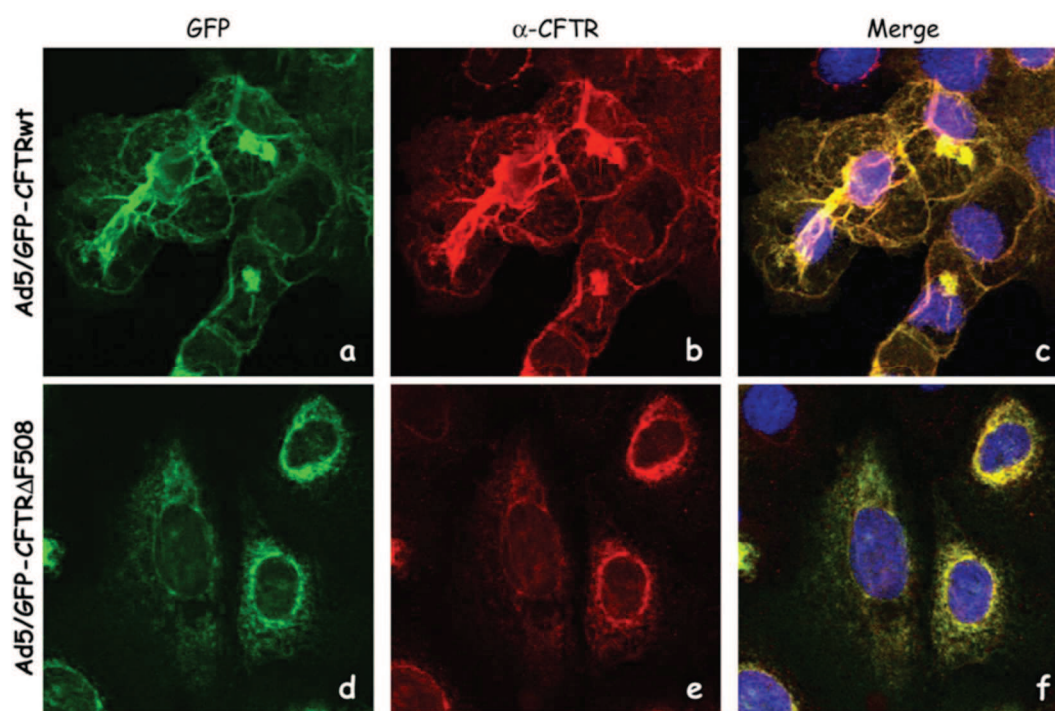


Figure 42. Clichés de microscopie confocale de CF-KM4 infectées par Ad5-GFP-CFTRwt ou Ad5-GFP-CFTR Δ F508
a & d : signal GFP, b & e : anticorps anti-CFTR couplé à la rhodamine, c & f : superposition des clichés : les signaux GFP et CFTR colocalisent. a, b & c : localisation de CFTR majoritairement à la membrane plasmique, d, e & f : localisation intracellulaire (Granio et al., 2007)

Ce vecteur a par la suite été amélioré. En effet, son récepteur nommé CAR, pour *Coxsackie and Adenovirus Receptor*, se situe au niveau des jonctions serrées intercellulaires, ce qui implique l'utilisation de fortes doses de vecteur. Ceci a non seulement des effets délétères sur la cellule, mais aussi sur la fonctionnalité du CFTR, qui s'en trouve diminuée. L'équipe a alors eu l'idée de créer une chimère, qui présenterait le corps de l'Ad5 avec les fibres de l'Ad35, permettant au vecteur de passer par une autre voie d'internalisation cellulaire : le récepteur CD46 (*Cluster of Differentiation 46*), localisé au pôle apical. Cette chimère, Ad5F35-GFP-CFTR a montré une efficacité de transduction 30 fois supérieure à l'Ad5-GFP-CFTR, une expression stable durant plusieurs semaines et une fonctionnalité à de moindres doses conduisant à une cytotoxicité diminuée (Granio et al., 2010).

Ce vecteur est potentiellement utilisable en thérapie génique de la mucoviscidose et disponible pour un essai préclinique. Malheureusement, l'abandon par Merck de son vaccin anti-VIH prototype basé sur un Ad5 recombinant en raison d'effets adverses inattendus, a eu un retentissement négatif sur tous les autres vecteurs de ce type applicables à la thérapie génique. L'équipe s'est par conséquent récemment tournée vers un autre type de vectorisation du gène CFTR : les vésicules extracellulaires.

Ce travail a été initié par Gaëlle Gonzalez qui a tout d'abord validé le transfert d'une nouvelle fonction à des cellules cibles par l'intermédiaire d'EV à l'aide de molécules bioactives modèles : CAR et CD46. Ces deux molécules sont des glycoprotéines transmembranaires à activité de récepteur viral, respectivement récepteur de l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5) ou de sérotype 35 (Ad35 ou récepteur chimérique Ad5F35). Les cellules CHO, CHO-CAR et CHO-CD46, ont été choisies comme cellules donneuses d'EV. Les EV ont été analysées par cytométrie en flux et se sont révélées immunoréactives avec leurs anticorps respectifs, à hauteur de 6 à 7% pour la fraction contenant les MV nommée MP₃₀ et 2 à 3% pour celle contenant les Exo appelée MP₁₀₀. Les interactions EV-Ad ont par ailleurs été confirmées par MET, montrant la présence de complexes EV_{CD46}-Ad5F35-GFP. Les EV ont par la suite été mises au contact de cellules CHO et la présence des récepteurs CAR et CD46 à la membrane des cellules cibles a été étudiée par cytométrie en flux. 6h après contact, 3% des cellules étaient récepteur-positives, 6 à 7% après 24h puis 15 à 18% après 72h. Ce pourcentage se stabilise ensuite pour redescendre progressivement à partir du jour 5. La fonctionnalité des récepteurs nouvellement acquis par les cellules a finalement été étudiée à 48h respectivement par un test de permissivité à l'Ad5-GFP ou Ad5F35-GFP. Les résultats montrent 2 à 10% de cellules fluorescentes vertes pour les CHO, ce qui correspond à la permissivité basale, due à des récepteurs alternatifs comme par exemple les héparanes sulfates (Corjon et al., 2011). Ce pourcentage est significativement augmenté lorsque les cellules ont préalablement été mises au contact d'EV_{CAR} ou EV_{CD46} respectivement (Figure 43). Par ailleurs, la spécificité de la permissivité est démontrée puisque les CHO traitées par les EV_{CAR} ne sont pas permissives à l'Ad5F35-GFP et inversement.

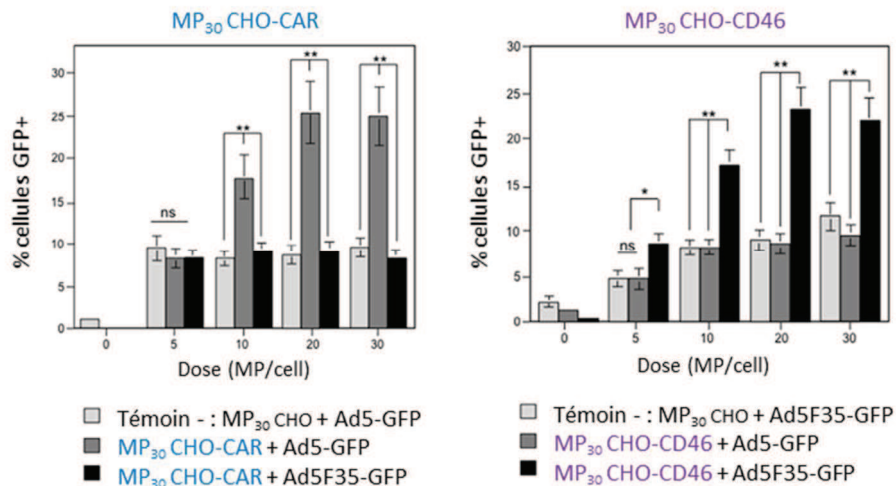


Figure 43. Test de permissivité aux vecteurs adénoviraux Ad5-GFP et Ad5F35-GFP de cellules CHO préalablement traitées respectivement par les MP₃₀-CAR et MP₃₀-CD46

Ces résultats valident la preuve de concept du transfert d'une nouvelle fonction à des cellules cibles par l'intermédiaire d'EV avec des protéines transmembranaires présentant un faible degré de complexité (Figure 44). Ils permettent à l'équipe d'envisager de transposer ce modèle au canal CFTR, qui présente, rappelons-le, 12 domaines transmembranaires (§2.3.2.1 p43).

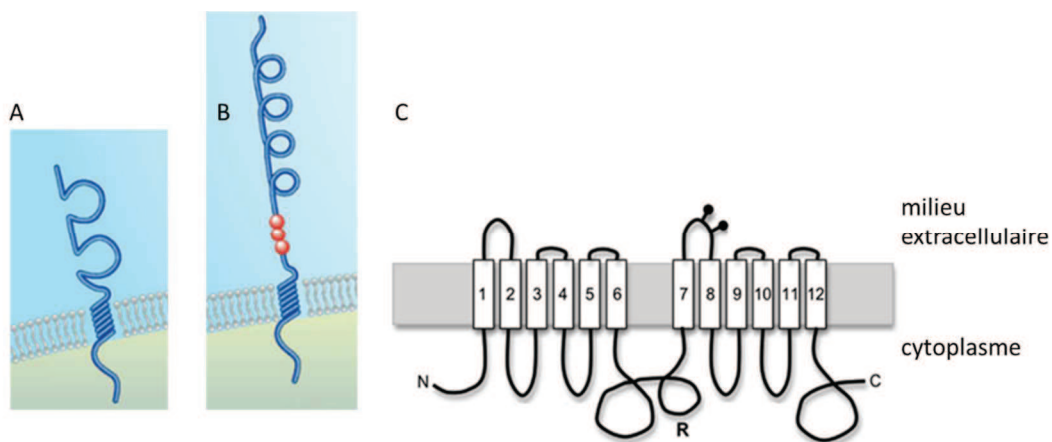


Figure 44. Complexité des protéines transmembranaires étudiées
 A. Récepteurs CAR ; B. Récepteur CD46 (Arnberg, 2012) ; C. CFTR (Kim and Skach, 2012)

A mon arrivée au laboratoire, Gaëlle Gonzalez avait débuté ce projet et démontré la présence de matériel biologique (ARNm *CFTR* et protéine CFTR) dans des cellules cibles traitées par des EV-GFP-CFTR. L'objectif de ma thèse était de poursuivre ce travail par la validation de la fonctionnalité de la protéine CFTR transférée ou néosynthétisée dans les cellules cibles, puis de valider ce modèle en cellules humaines. L'optimisation de la production des EV utilisant un ionophore du calcium a été un point intéressant que nous avons souhaité explorer. Enfin, des expériences ont également été réalisées dans le but d'étudier le mécanisme de transfert utilisé par les EV pour délivrer leur contenu dans les cellules cibles.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Techniques de biologie cellulaire

1.1. Culture cellulaire

1.1.1. Conditions de culture

Les lignées cellulaires utilisées dans ce travail sont des cellules adhérentes. Elles sont cultivées en atmosphère humide, à une température de 37°C, avec un pH constant proche de la neutralité. C'est le sodium bicarbonate (NaHCO_3), présent dans les milieux de culture, qui permet de conserver cette neutralité. En effet, les protons libérés par les cellules sont transformés en CO_2 selon l'équation $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Ceci implique une teneur en CO_2 régulée (5%).

Pour chaque type cellulaire, les milieux de culture utilisés sont listés paragraphe 1.1.2. Sauf indication contraire, ils sont complétés par 10 % de sérum de veau fœtal (*fetal bovine serum gold*, GE Healthcare Life Sciences), 200 U/mL de pénicilline et 200 µg/mL de streptomycine (PAA).

1.1.2. Lignées cellulaires utilisées dans cette étude

1.1.2.1. CHO-K1 et CHO-GFP-CFTR

Les CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*), cellules ovariennes de hamster chinois, possèdent une morphologie de type épithélial. Elles sont cultivées en milieu α -MEM (*Minimum Essential Media alpha*) (Gibco by Life Technologies).

Les CHO-GFP-CFTR surexpriment la protéine de fusion GFP-CFTR et sont issues de la transfection de CHO-K1 par le plasmide pCEP4-EGFP-CFTR (§2.1.2 p97). Ce dernier est épisomal et s'auto-réplique dans les cellules. Il se maintient grâce à une pression de sélection à l'hygromycine B (Life Technologies), à une concentration de 500 µg/mL.

1.1.2.2. A549, A549-GFP-CFTR, A549-Ad5-GFP-CFTR et A549-Ad5-GFP

Les A549 sont des cellules épithéliales respiratoires humaines, issues d'un carcinome pulmonaire. Elles se cultivent en milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco by Life Technologies).

Les A549-GFP-CFTR sont issues de la transfection de cellules A549 par le plasmide pEGFP-CFTR, qui se maintient grâce à une pression de sélection à la généticine ou G418 (Life Technologies), à une concentration de 400 µg/mL.

Les A549-Ad5-GFP-CFTR et A549-Ad5-GFP sont issues de la transduction de A549 par les vecteurs adénoviraux Ad5-GFP-CFTR et Ad5-GFP. Il ne s'agit pas de lignées stables, elles sont utilisées transitoirement pour la production d'EV (§1.3 et 1.4 p136).

1.1.2.3. CF-15 et Calu-3

Les CF-15 sont des cellules épithéliales respiratoires humaines, issues d'un patient homozygote pour la mutation deltaF508 (Jefferson et al., 1990). Il s'agit de cellules nasales qui ont été immortalisées à l'aide de l'antigène T du virus SV40. Elles sont cultivées dans le milieu CNT-17 (CellINtec) sur des supports recouverts de collagène I (Biocoat BD Biosciences).

Les Calu-3 sont des cellules épithéliales respiratoires humaines, issues d'une effusion pleurale associée à un adénocarcinome. Il s'agit de cellules glandulaires, qui sont naturellement riches en CFTRwt (Shen et al., 1994). Elles sont cultivées dans un milieu contenant 1/4 de F-12 et 3/4 de DMEM (Gibco by Life Technologies).

1.1.2.4. 16HBE-GFP-CFTR et HEK-293-GFP-CFTR

Lignées issues de 16HBE (*Human Bronchial Epithelial cells*) et HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) transfectées respectivement par le plasmide épisomal pCEP4-EGFP-CFTR et le plasmide pEGFP-CFTR. Elles sont cultivées en milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco by Life Technologies). Les plasmides sont maintenus grâce à une pression de sélection respectivement à l'hygromycine B (50 µg/mL) et à la généticine ou G418 (400 µg/mL) (Life Technologies).

1.1.2.5. MM39 et CF-KM4

Les MM39 et les CF-KM4 sont des cellules trachéales glandulaires séreuses humaines, exprimant respectivement les protéines CFTRwt et CFTRdelf508. Elles sont cultivées en milieu DMEM-Ham's F12, complété avec 1% d'Ultrosor G (Life Technologies), 1 mM de pyruvate de sodium, 5 mM de glutamine, 3 mM d'épinéphrine (Sigma), 200 U/mL de pénicilline et 200 µg/mL de streptomycine, sur des supports recouverts de collagène I (Biocoat BD Biosciences).

1.1.2.6. BHK-CFTR-HA

Les BHK-CFTR-HA sont des cellules rénales de hamster (*Baby Hamster Kidney*) transfectées par un plasmide conduisant à la surexpression de la protéine de fusion CFTR-HA (Sharma et al., 2004). La protéine d'intérêt est maintenue grâce à un milieu additionné de 50 µM d'aminoptérine (Sigma).

1.2. Transfection

1.2.1. Principe

La transfection est une méthode qui consiste à faire entrer de l'ADN plasmidique ou de l'ARN dans les cellules, sans utiliser de vecteurs viraux, par opposition à la transduction. La méthode utilisée dans ce

travail est la lipofection. Le mélange d'ADN plasmidique et de liposome cationique permet à l'ADN de s'affranchir de la répulsion électrostatique de la membrane plasmique, et par conséquent, de faciliter l'entrée de l'ADN dans les cellules.

1.2.2. Transfection des CHO-K1 et des 16HBE par le plasmide pCEP4-EGFP-CFTR

Les cellules sontensemencées dans une microplaque à 6 puits jusqu'à atteindre 80-90% de confluence puis le milieu est remplacé par du milieu sans sérum et sans antibiotique. Deux solutions sont préparées séparément : 10 µL de Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) et 4 µg de plasmide pCEP4-EGFP-CFTR (§2.1.2 p97) dans un volume final de 250 µL de milieu sans sérum et sans antibiotique. Ces deux solutions sont incubées 5 min à température ambiante. Le mélange des deux solutions est ensuite incubé 20 min à température ambiante avant d'être déposé sur les cellules. Après 3h d'incubation à 37°C, le milieu est remplacé par du milieu complet. Après 24h d'incubation à 37°C, l'antibiotique de sélection, hygromycine B (Life Technologies), est ajouté à une concentration de 500 µg/mL pour les CHO et 50 µg/mL pour les 16HBE.

1.2.3. Transfection des A549 et des HEK-293 par le plasmide pEGFP-CFTR

Le protocole est similaire à celui utilisé pour la transfection des CHO-K1 (§1.2.2 p95). Afin de gagner du temps, les transfections sont réalisées en boîte de Petri pour culture cellulaire de 10 cm de diamètre, sur des cellules à 60 - 70% de confluence. 30 µL de Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) et 20 µg de plasmide pEGFP-CFTR sont utilisés dans des volumes finaux de 250 µL d'opti-MEM sans sérum ni antibiotique. L'antibiotique de sélection est la généticine ou G418, ajoutée à une concentration de 400 µg/mL.

1.3. Transduction

1.3.1. Vecteurs adénoviraux Ad5-GFP et Ad5-GFP-CFTR

Les vecteurs adénoviraux Ad5-GFP et Ad5-GFP-CFTR ont été construits par la société Transgène SA (Strasbourg), grâce à une recombinaison homologe entre le plasmide de transfert pTG14682 et les plasmides pEGFP-C1 (Clontech Europe) ou pEGFP-CFTR. Ce dernier a été construit au sein du laboratoire (Granio et al., 2007), en insérant par PCR la séquence codant la protéine CFTR en position C-terminale de la séquence codant la protéine GFP. Une séquence « linker » de sept résidus d'acides aminés sépare les deux protéines (SGLRSRA).

Ces vecteurs sont dérivés de l'Ad5 de première génération. Leurs séquences sont délétées des régions E1 et E3, les empêchant de se répliquer dans les cellules cibles (§1.B p85).

1.3.2. Protocole

Les cellules A549 sontensemencées en flacons T150 jusqu'à atteindre 80% de confluence. Elles sont ensuite incubées 1h à 37°C en présence de 14 mL de milieu contenant les vecteurs adénoviraux Ad5-GFP ou Ad5-GFP-CFTR, respectivement à une dose de 20 à 50 particules infectieuses par cellule (MOI 20 ou 50) (§1.3 p136 et 1.4 p137). Ce volume est ensuite complété à 20 mL et les cellules sont incubées 24h à 72h à 37°C.

1.4. Test de cytotoxicité : MTT

Principe

Le test MTT est une méthode permettant de mettre en évidence les cellules vivantes, et par déduction, de déterminer si les traitements testés sont toxiques pour les cellules et dans quelle mesure. Cette méthode repose sur la réduction, par la succinate déshydrogénase mitochondriale, du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) en formazan. Ce dernier forme un précipité violet qui est ensuite solubilisé afin de lire l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre. Ce précipité violet se formant uniquement dans les cellules métaboliquement actives, l'intensité de la couleur est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes. La densité optique obtenue pour les cellules n'ayant pas reçu de traitement est la valeur référence et définit la valeur correspondant à 100% de survie cellulaire.

Protocole

Les cellules A549 et CF15 doivent être à 100% de confluence dans une microplaque à 96 puits le jour où le test est effectué. 24h après le traitement d'intérêt, 30 µL de solution de MTT à une concentration de 7,5 mg/mL sont déposés dans chacun des puits. Les cellules sont ensuite incubées 4h à 37°C, puis le surnageant est éliminé. Les cristaux sont dissous à l'aide de 100 µL de DMSO. La microplaque est ensuite lue à 540 nm dans l'heure à l'aide du spectrophotomètre Victor et du logiciel Wallac 1420 (Perkin Elmer).

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1. Clonage

2.1.1. Principe

Les plasmides, séquences d'ADN bicaténaire et circulaire, s'autorépliquent dans les bactéries et sont de véritables outils de biologie moléculaire pour la construction de vecteurs porteurs des gènes d'intérêt. Le clonage consiste à intégrer la séquence codant un gène d'intérêt, nommée « insert », dans un plasmide d'intérêt nommé « vecteur ». Ils sont tout d'abord digérés séparément à l'aide d'enzymes de restriction, les endonucléases, qui clivent les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides. Ceci permet d'isoler les fragments d'intérêt, qui sont ensuite mis en présence d'une autre enzyme, la ligase,

de manière à reformer les liaisons phosphodiester et ainsi générer un nouveau plasmide. Afin de sélectionner et d'amplifier les vecteurs qui ont intégré l'insert, des bactéries compétentes sont tout d'abord transformées avec les produits de « ligation », et étalées sur une boîte de gélose contenant un antibiotique de sélection. Seules les bactéries qui ont été transformées possèdent le gène de résistance à l'antibiotique et sont capables de se répliquer. Plusieurs colonies sont ensuite cultivées séparément en petits volumes. Leurs plasmides sont extraits en réalisant une « miniprep », puis criblés par digestions enzymatiques. Les vecteurs ayant intégré l'insert, présentant un profil de digestion spécifique, sont sélectionnés et séquencés de manière à s'assurer qu'aucune mutation n'a été introduite dans le gène d'intérêt. Finalement, la petite culture de bactéries correspondante est remise en culture en plus grand volume de manière à amplifier le plasmide d'intérêt. Celui-ci est ensuite extrait grâce à une « midiprep » ou une « maxiprep » et peut être utilisé pour exprimer ou surexprimer le gène d'intérêt dans les cellules par transfection (§1.2 p94) ou transduction (§1.3 p95).

2.1.2. Clonage de la séquence codant la protéine de fusion GFP-CFTR dans le plasmide pCEP4

2.1.2.1. Plasmides utilisés et stratégie de clonage

Le plasmide pCEP4 (Life Technologies) contient l'origine de réplication du virus Epstein-Barr (oriP) ainsi que l'antigène nucléaire codé par le gène EBNA-1, qui permettent une réplication du plasmide extrachromosomique et synchrone de la division cellulaire (Figure 45 A).

La séquence codant la protéine GFP-CFTR est présente dans le plasmide pEGFP-CFTR (Figure 45 B), précédemment construit au sein du laboratoire en clonant la séquence codant CFTR dans le plasmide pEGFP-C1 (Granio et al., 2007) (§1.3.1 p95).

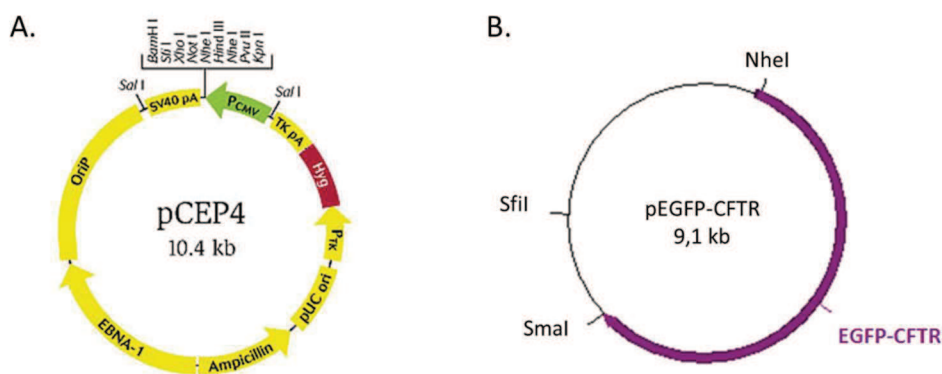


Figure 45. Cartes des plasmides pCEP4 et pEGFP-CFTR

Le fragment d'intérêt codant la protéine GFP-CFTR, nommé « insert », est borné par les sites de restriction NheI et SmaI. NheI est également présent dans le plasmide « vecteur » pCEP4, par contre, ce n'est pas le cas pour SmaI. Puisque l'enzyme de restriction SmaI génère des extrémités franches, la stratégie consiste à créer également une extrémité franche dans le plasmide « vecteur » en utilisant l'activité exonucléasique 3'-5' de la T4-DNA polymérase après action d'une enzyme générant des extrémités cohésives.

2.1.2.2. Digestions des plasmides

pCEP4 : 5 µg de plasmide sont digérés 1h à 50°C à l'aide de 50 unités de l'enzyme de restriction SfiI (Thermo Scientific), en présence du tampon préconisé par le fabricant, dans un volume final de 100 µL. Remarque : le plasmide pCEP4 est préalablement préparé dans des bactéries compétentes dépourvues des gènes codant les méthylases *dam* et *dcm* de manière à ce que l'enzyme de restriction SfiI puisse agir. 10 unités de T4-DNA polymérase, 2 µL de dNTP (10 mM), ainsi que le tampon adéquat sont ajoutés au précédent mélange. Après 5 min à température ambiante, le mélange est placé 5 min à 75°C de manière à inactiver l'enzyme. Une mini-dialyse - 10 min sur de l'eau ultrapure (milliQ) - est ensuite réalisée afin de changer le tampon. Le dialysat est ensuite incubé 1h à 37°C en présence de l'enzyme NheI et du tampon préconisé par le fabricant.

pEGFP-CFTR : 25 µg de plasmide sont digérés 1h à 30°C à l'aide de 70 unités de l'enzyme de restriction SmaI (Thermo Scientific), en présence du tampon préconisé par le fabricant, dans un volume final de 100 µL. 70 unités de l'enzyme NheI sont ensuite ajoutés, et le mélange est incubé 1h à 37°C. Enfin, 70 unités de l'enzyme SfiI sont ajoutées, et le mélange est incubé 1h à 50°C. Cette dernière étape permet de digérer le fragment résiduel de manière à le séparer du fragment d'intérêt lors de la prochaine étape.

2.1.2.3. Purification du « vecteur » et de l' « insert »

pCEP4 : le plasmide vecteur linéarisé est purifié grâce au kit Nucleospin extract II (Macherey-Nagel). Il s'agit d'une purification sur colonne échangeuse d'ions. Grâce à une force ionique élevée, la résine est chargée positivement, et interagit alors avec l'ADN, chargé négativement (Figure 46). Cette purification a lieu en présence d'agents chaotropiques qui dénaturent les protéines de liaison à l'ADN ainsi que les structures secondaires, favorisant l'interaction de l'ADN avec la colonne de silice. Un lavage permet ensuite d'éliminer les contaminants tels que les sels ou encore les macromolécules solubles. L'ADN est enfin élué en diminuant la force ionique. Le petit fragment compris entre NheI et SmaI n'est pas retenu par la colonne, permettant de purifier le fragment d'intérêt linéarisé.

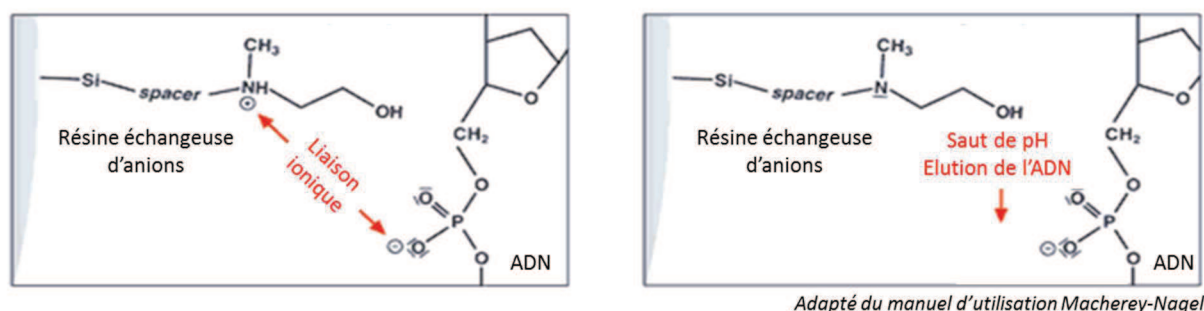


Figure 46. Schéma illustrant le principe de purification de l'ADN sur colonne de silice

Insert GFP-CFTR : les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose 1% en tampon TBE 0,5%. L'électrophorèse en gel d'agarose est une méthode qui permet de séparer dans un champ électrique des fragments d'ADN selon leur taille. En effet, l'ADN étant chargé négativement, les fragments migrent vers le pôle positif. Les plus petits fragments auront plus de facilité à traverser les mailles du

gel et iront plus vite donc plus loin dans le gel. La bande d'intérêt repérée grâce à un marqueur de taille (100 pb ou 1kb DNA *ladder*, Fermentas) est ensuite découpée à l'aide d'un scalpel et l'ADN est extrait à l'aide du kit Nucleospin extract II (Macherey-Nagel). Le principe est celui énoncé précédemment, avec une étape en amont qui consiste à dissoudre le gel d'agarose par la chaleur dans le but de remettre l'ADN en solution.

2.1.2.4. Dosage de l'ADN et « ligation »

La propriété d'absorbance de l'ADN dans l'ultra-violet est utilisée pour doser l'insert et le vecteur à l'aide du spectrophotomètre Biophotometer (Eppendorf). Une unité d'absorbance à 260 nm équivaut à 50 µg/mL.

Les deux fragments sont ensuite mis en présence de 10 unités de T4 DNA ligase ainsi que du tampon fourni par le fabriquant selon les rapports insert : vecteur de 3 : 1 et 5 : 1, à raison de 100 ng de vecteur et en tenant compte de la longueur des fragments grâce à la formule suivante :

$$\text{Quantité insert (ng)} = \frac{3 \text{ (ou 5)} \times \text{quantité vecteur (ng)} \times \text{taille insert (kb)}}{\text{taille vecteur (kb)}}$$

La « ligation » se déroule dans un volume total de 20 µL durant 2h à température ambiante.

2.1.2.5. Transformation bactérienne

100 µL de bactéries compétentes *E. coli* TOP 10 sont mises en présence des produits de « ligation » durant 15 min à 0°C afin de stabiliser les mouvements moléculaires, puis 5 minutes à 37°C afin de créer le choc thermique. Ce dernier accroît la perméabilité de la membrane bactérienne et favorise ainsi la pénétration du plasmide. Le mélange est ensuite placé 5 min à 0°C, puis 150 µL de milieu de culture LB sont ajoutés au mélange. Ce dernier est ensuite incubé 30 minutes à 37°C de manière à ce que les bactéries commencent à exprimer le gène de résistance à l'antibiotique dont la séquence codante est présente dans le plasmide. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte de Petri LB-agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline. Elles sont incubées une nuit à 37°C.

2.1.2.6. Précultures, minipréparation d'ADN plasmidique et digestions contrôles

Les colonies présentes sur la boîte sont mises en pré-cultures chacune dans 2 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline durant 6h sous agitation à 37°C. L'ADN plasmidique est ensuite extrait et purifié à l'aide du kit « Plasmid DNA purification » (Macherey Nagel). 1 µg de chaque plasmide est ensuite digéré avec 10 unités d'enzyme *SacI* (Thermo Scientific) durant 30 min à 37°C (Figure 47), puis déposé sur gel d'agarose 1% afin de vérifier la présence de l'insert. Les plasmides qui présentent le profil de digestion attendu sont sélectionnés et envoyés au séquençage.

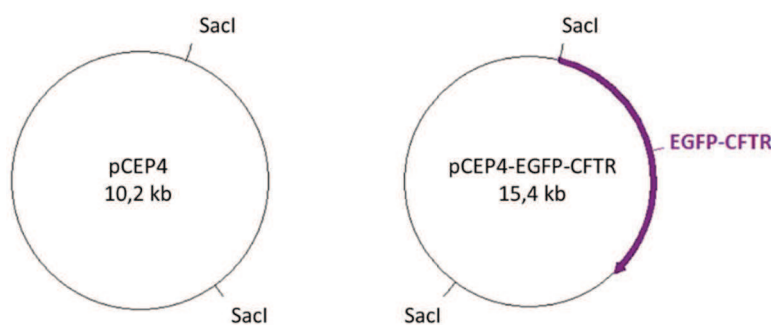


Figure 47. Cartes des plasmides pCEP4, avec et sans insert

2.1.2.7. Séquençage et midipréparation des plasmides d'intérêt

Les plasmides sont séquencés par la société GATC Biotech, à l'aide de dix amorces nucléotidiques réparties toutes les 500 pb. Les séquences obtenues sont ensuite analysées grâce au logiciel GATC Viewer, ainsi qu'à différents sites internet. <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php> permet de fusionner les dix séquences obtenues de manière à générer une séquence complète, http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/, permet de traduire la séquence nucléotidique en séquence protéique, et enfin <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, permet d'aligner la séquence obtenue avec celle d'intérêt.

Les bactéries correspondant aux plasmides d'intérêt sont ensuite remises en culture dans 100 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline, sous agitation une nuit à 37°C. Les plasmides sont enfin extraits à l'aide du kit « Plasmid DNA purification » (Macherey Nagel).

2.1.3. Clonage de la séquence codant la protéine de fusion GFP-CFTR dans le plasmide pLXRN

2.1.3.1. Plasmides utilisés et stratégie de clonage

Le plasmide pLXRN est un plasmide intermédiaire, utilisé par la suite pour créer un rétrovirus exprimant la protéine de fusion GFP-CFTR.

La séquence codant GFP-CFTR est issue du plasmide pEGFP-CFTR (Figure 48) précédemment cité (§2.1.2.1 p97).

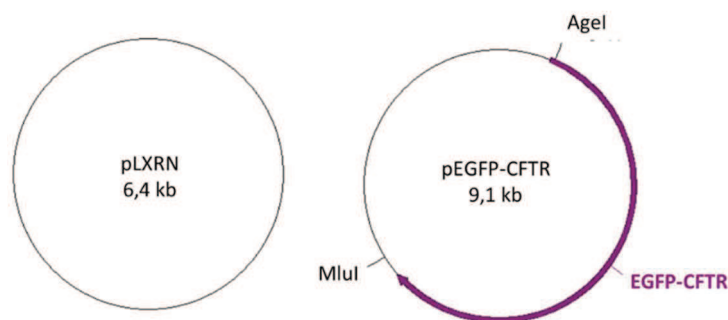


Figure 48. Cartes des plasmides pLXRN et pEGFP-CFTR

Le fragment d'intérêt GFP-CFTR, nommé « insert », est borné par les sites de restriction AgeI et MluI. Puisqu'aucun de ces sites n'est présent dans le plasmide « vecteur », une courte séquence contenant uniquement des sites de restriction (Figure 49) est préalablement conçue et clonée dans le plasmide vecteur, de manière à y insérer les sites de restriction d'intérêt. Cette séquence est appelée ici « MCS » pour *Multiple Cloning Site*.

Extrémité BamHI, AgeI, NotI, PmlI, XbaI, MluI, Extrémité XhoI
 5' GATCCACCGGTGCGGCCGCCACGTGTCTAGAACGCGTC 3'
 3' GTGGCCACGCCGGCGGTGCACAGATCTTGCAGAGCT 5'

Figure 49. Enchaînement de sites de restriction ajoutés au plasmide « vecteur »

2.1.3.2. Digestions des plasmides

Clonage de la séquence MCS dans le plasmide pLXRN :

Préparation du vecteur :

2,5 µg de plasmide sont digérés 1h à 37°C à l'aide de 40 unités d'enzyme de restriction BamHI (Thermo Scientific), en présence du tampon préconisé par le fabricant, dans un volume final de 100 µL. Une mini-dialyse - 10 min sur de l'eau ultrapure (milliQ) - permet de changer le tampon. Le dialysat est ensuite digéré 1h à 37°C à l'aide de 40 unités de l'enzyme de restriction XhoI dans un volume final de 120 µL.

Préparation de l'insert :

Les oligonucléotides, fabriqués par Life Technologies, sont préparés à une concentration de 1 µg/µL. 5 µL de chaque solution d'oligonucléotide sont ensuite ajoutés à 40 µL de tampon Annealing (Ambion). Le mélange est ensuite incubé 3 min à 94°C, puis 30 min à 37°C, et enfin 30 min à température ambiante à l'aide du thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700 (PE Applied Biosystems). Cette étape permet de générer un oligonucléotide double brin présentant déjà les extrémités cohésives compatibles avec le vecteur digéré.

Clonage de la séquence codant GFP-CFTR dans le plasmide pLXRN-MCS :

La préparation de l'insert et du vecteur se font selon le même protocole. 5 µg de plasmide vecteur ou 25 µg de plasmide contenant l'insert sont digérés 1h à 37°C à l'aide de 50 à 70 unités d'enzyme de restriction AgeI (Thermo Scientific), en présence du tampon préconisé par le fabricant, dans un volume final de 100 µL. Une mini-dialyse - 10 min sur de l'eau ultrapure (milliQ) - permet de changer le tampon. Les dialysats sont ensuite digérés 1h à 37°C à l'aide de 50 à 70 unités de l'enzyme de restriction MluI dans un volume final de 150 µL.

Les protocoles utilisés pour les étapes suivantes sont similaires à ceux expliqués précédemment (§2.1.2.3 p98 à §2.1.2.7 p100).

2.2. Extraction et dosage des protéines

Les cellules d'intérêt sont lavées au PBS puis grattées dans un tampon de lyse contenant 50 mM de Tris pH 8, 150 mM de NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% de NP40 et un cocktail d'antiprotéases « cOmplete Mini EDTA free » (Roche). Les EV sont lysées à l'aide de 0,01% SDS. Le lysat est incubé 30 min sur de la glace, avec agitation toutes les 10 min, puis centrifugé 10 min à 11 000 g à +4°C. Le surnageant contient les protéines d'intérêt, qui sont dosées puis stockées à -20°C.

La technique de dosage des protéines utilisée est celle de Bradford. Il s'agit d'un dosage colorimétrique qui exploite le changement de longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie lorsqu'il se fixe sur les protéines par des interactions non-covalentes, hydrophobes ou ioniques. Cette réaction est proportionnelle à la concentration en protéines, qui peut ainsi être déterminée à l'aide d'une gamme étalon d'une protéine standard, la BSA (*Bovine Serum Albumin*). 1 mL de chaque standard est déposé dans une cuve, puis 1 mL de réactif de Bradford est ajouté. L'absorbance des échantillons est lue à 595 nm après homogénéisation et 5 min d'incubation. Les échantillons sont dilués de manière à entrer dans la gamme étalon.

2.3. Détection de protéines par western blot

Principe

Le western blot est composé de deux étapes majeures. Il consiste dans un premier temps à séparer les protéines d'un mélange selon leur taille. Cette première étape est réalisée dans un gel de polyacrylamide en appliquant un champ électrique. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane, sur laquelle la protéine d'intérêt pourra être révélée grâce à un anticorps qui lui est spécifique.

Protocole

Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE)

50 µg de lysat protéique est préparé dans du tampon Laemmli contenant 60 mM de Tris HCl pH 6,8, 2% de SDS ayant pour rôle de charger toutes les protéines négativement, 10% de glycérol afin d'augmenter la densité de l'échantillon et permettre leur maintien dans les puits lors du dépôt, mais

aussi du bleu de bromophénol 300 µg/mL qui permet de suivre la progression de la migration des échantillons dans le gel. Dans le but de réduire les ponts disulfures, 5 % de β-mercaptoéthanol ou 100 mM de DTT pour la détection de la protéine CFTR sont ajoutés extemporanément. La dénaturation des protéines est complétée par un chauffage à 95°C durant 5 min. Cette étape entraîne la dénaturation complète des motifs antigéniques de la protéine CFTR, elle est donc remplacée par une incubation de 20 min à 37°C. Les échantillons sont ensuite déposés dans un gel de polyacrylamide composé d'un gel de concentration et d'un gel de séparation dont la composition est décrite Tableau 5. L'APS et le TEMED sont ajoutés extemporanément et permettent la polymérisation des gels. Les protéines chargées négativement migrent vers le pôle positif plus ou moins rapidement en fonction de leur taille. Le premier gel permet de concentrer les protéines afin qu'elles entrent en même temps dans le deuxième gel où elles seront séparées. Le pourcentage d'acrylamide détermine le taux de réticulation : plus il est faible et plus il permettra de séparer les protéines de haut poids moléculaire. Les gels sont respectivement préparés à 8% pour la protéine CFTR et 12% pour Tsg-101. La migration s'effectue à 80 V en présence d'un marqueur de poids moléculaire (SM0671, Fermentas). La composition du tampon de migration est la suivante : Tris 25 mM, glycine 192 mM, 0,1% SDS pH 8,3.

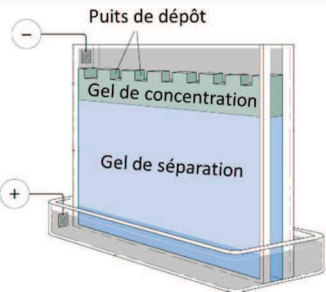
	Gel de concentration		Gel de séparation	
	4%	8%	10%	12%
Acrylamide 30%	660 µL	2,6 mL	3,3 mL	4 mL
Tris HCl 1M pH 6,8 ou 8,8	625 µL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL
H2O	3.58 mL	3,3 mL	2,6 mL	2 mL
SDS 20%	100 µL	200 µL	200 µL	200 µL
APS 10%	25 µL	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Tableau 5. Composition des gels de polyacrylamide
Image adaptée de <http://www.siumed.edu>

Transfert sur membrane et révélation

Les protéines ainsi séparées sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose afin de procéder à leur révélation. Le gel est mis au contact de la membrane dans un dispositif en sandwich (Figure 50) et un courant de 100 V durant 30 min pour Tsg-101, ou 80 V durant 1h30 pour CFTR, est appliqué afin que les protéines sortent du gel et adhèrent à la membrane. La composition du tampon de transfert est la suivante : Tris 25 mM, glycine 192 mM pH 8,3, 20% EtOH absolu.

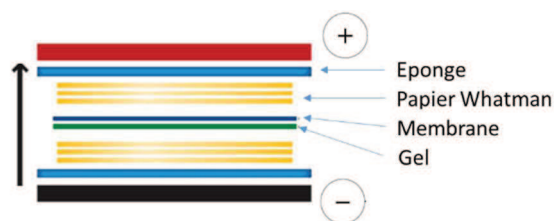


Figure 50. Transfert des protéines du gel de polyacrylamide à la membrane de nitrocellulose

La membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps spécifiques pour révéler les protéines d'intérêt. Afin d'éviter l'hybridation aspécifique des anticorps sur la membrane, elle est préalablement saturée grâce à une incubation dans du tampon TBS-T avec 5% de lait écrémé durant 1h. Le tampon TBS-T utilisé contient 300 mM de NaCl, 10 mM de Tris, pH 7,6 et 0,1 % de tween 20. La membrane est ensuite lavée 3 fois avec une solution de TBS-T, puis incubée avec l'anticorps primaire pendant la nuit à +4°C dans un tampon TBS-T 0,1 % avec 5% lait. Les anticorps utilisés ainsi que leur dilution sont répertoriés dans le Tableau 6. Une série de 6 lavages de 5 min avec du TBS-T sont ensuite réalisés avant d'incuber la membrane 1h à température ambiante sur agitateur avec l'anticorps secondaire dilué dans un tampon TBS-T 0,1% (Tableau 6). Après 4 lavages de 5 min avec du TSB-T, la révélation est ensuite réalisée à l'aide du kit « Supersignal west pico chemiluminescent substrate » (Thermo Fisher Scientific), qui consiste à incuber la membrane en présence des substrats de la peroxydase. En effet, la peroxydase de raifort (HRP) en présence de peroxyde d'hydrogène catalyse l'oxydation du luminol conduisant à une émission de lumière (Figure 51). Le signal impressionne un film autoradiographique qui est révélé et fixé à l'aide d'une développeuse (Cawomat 2000 IR).

Nom de l'anticorps	Référence de l'anticorps	Dilution
CFTR (clone M24.1)	MAB25031 (R&D Systems)	200 ^{ème}
GFP	11814460001 (Roche)	1 000 ^{ème}
Tsg-101	SC 6037 (Santa Cruz)	500 ^{ème}
anti-mouse IgG peroxydase	A5906 (Sigma)	10 000 ^{ème}

Tableau 6. Anticorps utilisés pour les western blots

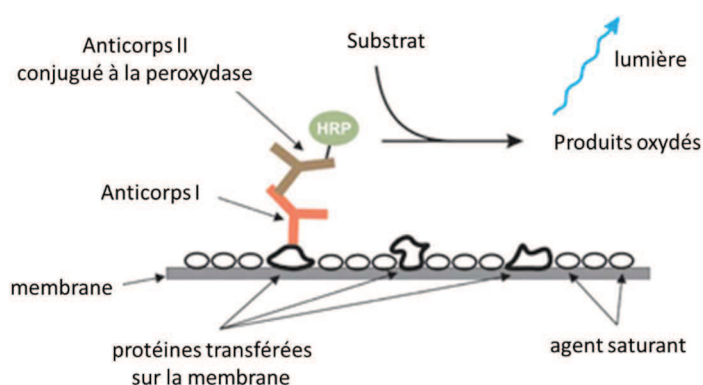


Figure 51. Principe de la détection de protéines par western blot
Adapté de http://advansta.com/Chemiluminescent_Western_Detection.html

2.4. Extraction et dosage d'ARN

L'extraction d'ARN cellulaire est réalisée à l'aide du kit « Nucleospin RNA » (Macherey-Nagel). 350 µL de tampon nommé RA1 additionné de 3,5 µL de β-mercaptoéthanol sont ajoutés à un culot sec de 1 à $2 \cdot 10^6$ cellules. Ce tampon de lyse est adapté à l'extraction des ARN puisqu'il contient des agents permettant d'inactiver les RNAses, présents dans tous les échantillons biologiques. Le mélange est vortexé, puis passé au travers d'une aiguille d'un diamètre de 0,9 mm afin d'aider la lyse des cellules, et enfin filtré par centrifugation 1 min à 11 000 g. 350 µL d'éthanol 70% sont ensuite ajoutés au filtrat pour ajuster les conditions de fixation de l'ARN, qui est ainsi retenu sur une colonne de silice après centrifugation 30 sec à 11 000 g. La membrane est ensuite dessalée grâce à 350 µL de tampon MDB. Après une centrifugation 1 min à 11 000 g, une étape de digestion de l'ADN est ensuite réalisée en incubant la colonne 15 min à température ambiante avec 95 µL de rDNase fournie par le kit. L'enzyme est inactivée à l'aide de 200 µL de RAW2. Après une centrifugation 30 sec à 11 000 g, deux lavages successifs sont réalisés avec 600 puis 250 µL de tampon RA3. Le premier lavage est effectué durant 30 sec à 11 000 g, le deuxième durant 2 min à 11 000g afin de sécher la membrane. L'élution est ensuite réalisée avec 60 µL d'eau « RNase free » à l'aide d'une dernière centrifugation 1 min à 11 000 g. Les échantillons sont aliquotés, dosés au spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) puis stockés à -80°C. Comme pour l'ADN, l'ARN absorbe à 260 nm, une unité d'absorbance correspond à 40 µg/mL.

Pour les ARN présents dans les EV, le kit « QIAamp viral RNA Mini » (Qiagen) a été utilisé. 560 µL de tampon AVL contenant le « RNA carrier » ont été ajoutés à 140 µL de suspension contenant les EV. Après mélange par pulses de 15 sec, le lysat est incubé 10 min à température ambiante, puis 560 µL d'éthanol absolu sont ajoutés par échantillon afin d'ajuster les conditions de fixation de l'ARN. Après nouveau mélange par pulses de 15 sec, l'échantillon est transféré dans la mini colonne QIAamp et centrifugé 1 min à 6000 g. Deux lavages sont ensuite effectués avec 500 µL de tampon AW1 puis AW2. La colonne est centrifugée respectivement 1 min à 6 000 g puis 3 min à 20 000 g de manière à sécher la membrane. L'élution est ensuite effectuée à l'aide de 60 µL de tampon AVE et d'une centrifugation 1 min à 6 000 g après 1 min d'incubation à température ambiante. Le traitement des échantillons à la DNase est effectué ensuite à l'aide du kit « Turbo DNase free » (Ambion). 1 µL de DNase et 1µL de tampon 10x Turbo DNase sont ajoutés à 10 µL d'ARN. Le mélange est incubé 20-30 min à 37°C puis la DNase est inactivée à l'aide de 2 µL de « DNase inactivation reagent », durant 5 min à température ambiante en mélangeant occasionnellement. Enfin, une centrifugation de 1 min 30 à 10 000 g est réalisée, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et l'ARN est aliquoté puis dosé au Nanodrop avant d'être stocké à -80°C.

2.5. Détection d'ARNm par RT-PCR et quantification par qRT-PCR

Principe

La PCR (*polymerase chain reaction*) est une réaction de polymérisation en chaîne permettant d'amplifier une séquence nucléotidique précise à partir d'une séquence d'ADN double brin. A l'aide d'un thermocycleur qui permet de réguler finement et rapidement la température à l'intérieur d'une enceinte, l'ADN est tout d'abord dénaturé à haute température, de manière à rompre les liaisons de faible énergie qui maintiennent les deux brins de la double hélice. Ceci permet aux amorces complémentaires des extrémités du fragment d'intérêt de s'hybrider. La température à cette étape

est fonction de la longueur et de la composition en base des amorces. La phase suivante est l'élongation, encore appelée extension des amorces. Ces dernières servent en effet de point de départ à la polymérisation de l'ADN grâce à l'ADN polymérase qui synthétise l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Les nucléotides sont alors ajoutés successivement sur le principe de la complémentarité des bases A-T / G-C. Les polymérases utilisées sont fidèles et fonctionnent généralement à 72°C. A la fin de cette étape, un fragment d'ADN d'intérêt double brin a été copié pour donner deux fragments d'intérêt double brin (Figure 52 A). L'ensemble de ces étapes forme un cycle et la multiplication de ces cycles permet une amplification exponentielle de l'ADN (Figure 52 B). La visualisation du produit PCR est réalisée grâce à un gel d'agarose (§ 2.1.2.3 p98) afin de révéler la présence d'une bande à la taille attendue témoignant de la présence de l'acide nucléique d'intérêt dans l'échantillon.

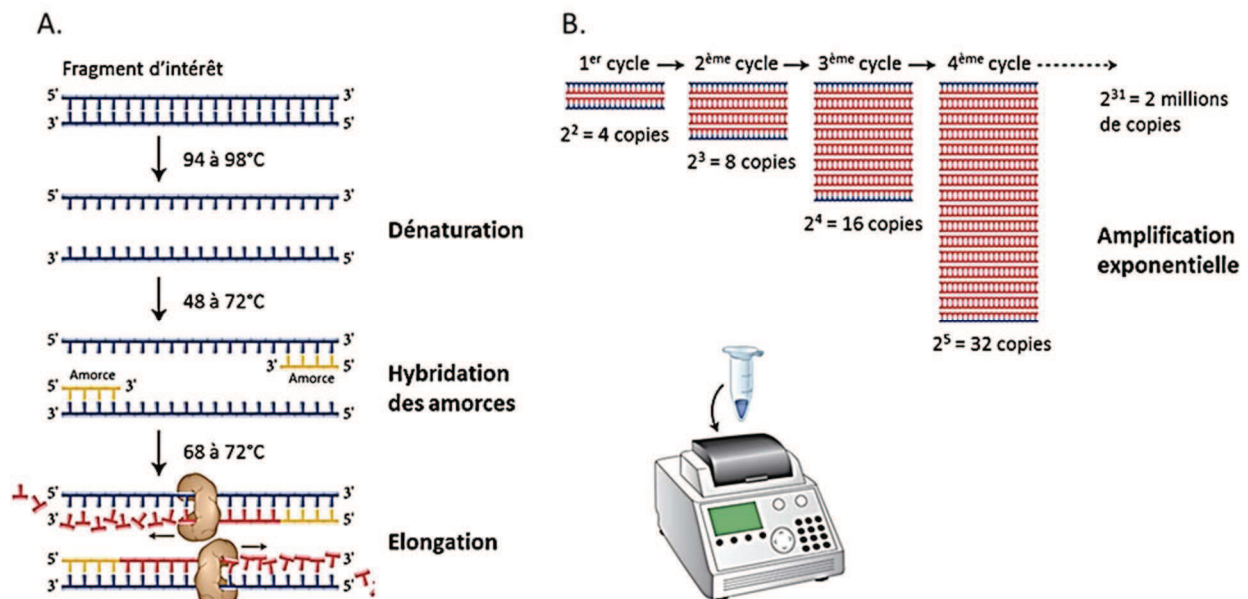


Figure 52. Schéma du principe de polymérisation en chaîne (PCR)

Adapté de <https://www.neb.com/products/pcr-polymerases-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes>

La PCR quantitative (qPCR) est une technique très sensible qui permet de suivre l'amplification d'un fragment d'intérêt en temps réel grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents tels que des sondes spécifiques ou du Sybr green. Ce dernier émet de la fluorescence lorsqu'il se lie à l'ADN double brin. Ainsi, la fluorescence est mesurée à chaque cycle et l'amplification est suivie au cours du temps. L'apparition du signal est inversement proportionnelle à sa concentration puisque plus le fragment d'intérêt sera présent en grande quantité, plus il sera détectable rapidement. Grâce à une gamme étalon et la présence d'un standard interne, la qPCR permet de quantifier de manière relative le fragment d'intérêt.

La RT-PCR (*Reverse Transcription* PCR) et la qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription* PCR) permettent de réaliser une PCR ou une qPCR à partir d'ARNm. L'étape de rétrotranscription qui précède consiste à générer le brin complémentaire de l'ARNm grâce à une polymérase ARN dépendante : la transcriptase inverse. Un complexe hybride ARN-ADN est ainsi créé. La RNase H dégrade ensuite spécifiquement l'ARN présent dans ce complexe pour donner naissance à un ADNc simple brin, qui pourra être amplifié après génération du brin complémentaire lors de la première étape de PCR.

Protocole RT

100 ng d'ARN sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit « iscript DNA synthesis kit » (Biorad) et de l'appareil mastercycler® (Eppendorf). La réaction a lieu dans un volume final de 20 µL, à l'aide d'1 µL de rétrotranscriptase et 4 µL de tampon fourni par le kit « iscript reaction mix ». Le programme utilisé est le suivant : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C puis 5 min à 85°C permettant de dénaturer l'enzyme.

Protocole PCR

La PCR est réalisée à l'aide de la polymérase GoTaq G2 (Promega) et de l'appareil mastercycler® (Eppendorf). 2 µL de cDNA sont ajoutés à un mix contenant pour un échantillon : 0,25 µL de GoTaq G2 (5 U/µL), 5 µL de tampon 5X fourni avec l'enzyme, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL d'amorces sens et anti-sens 10 µM (Tableau 7) qsp 23 µL H₂O ultrapure (RNase et DNase free) pour un volume final de 25 µL. Le programme de PCR utilisé est le suivant : 2 min à 95°C, [30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C, 30 sec à 72°C] x 35 cycles, puis 5 min à 72°C. 10 µL de produit PCR sont déposés sur gel d'agarose 1,5%.

Protocole qPCR

La qPCR est réalisée à l'aide du kit « KAPA Sybr® Fast qPCR kit » (KAPA Biosystems) et de l'appareil StepOnePlus™ (Thermofisher). Les cDNA sont préalablement dilués cinq fois dans de l'eau commerciale (*suspension medium* Biomérieux ref 70640). 2 µL sont ensuite ajoutés au master mix contenant pour un échantillon : 10 µL de 2X KAPA Sybr Fast, 0,8 µL d'amorces sens et anti-sens 10 µM (Tableau 7), 0,4 µL de 50X ROX high, qsp 18 µL H₂O commerciale pour un volume final de 20 µL par essai. La préparation de l'expérience se déroule sur la glace afin de préserver les échantillons de toute dégradation. Le programme suivi est le suivant : 95°C 3 min, [95°C 15 sec, 60°C 1 min] x 40 cycles. Les échantillons sont analysés en triplicat et le gène de référence choisi est RPL27. L'efficacité des amorces, vérifiée grâce à une gamme étalon, est voisine de 2.

Nom du gène recherché	Séquences des amorces	
	Amorce sens (5' -> 3')	Amorce anti-sens (5' -> 3')
CFTR	AGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTC	AAGTAGTTTAAACAAGTCCAACAAC
GFP	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	CTCGCCGGACACGCTGAAC
GFP-CFTR	AACGAGAAGCGCATCACATG	GCGCTGTCTGTATCCTTCTCTCAA
RPL27	ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA	TCTGAAGACATCCTTATTGACG

Tableau 7. Séquences des amorces utilisées pour les expériences de PCR et qRT-PCR

Remarque : les amorces utilisées pour la détection de la séquence codant la protéine de fusion GFP-CFTR sont à cheval entre la séquence codant la protéine GFP et celle codant la protéine CFTR, de manière à distinguer le transgène de la séquence codant la protéine CFTR endogène.

3. Production et purification des EV

3.1. Sans stimulation

Les EV sont naturellement libérées par les cellules et se retrouvent donc dans le surnageant de culture. Les cellules sont cultivées jusqu'à 80-90% de confluence dans des flacons T150, soit l'équivalent de

$5 \cdot 10^7$ cellules/flacon. Trois lavages des cellules sont ensuite effectués à l'aide de PBS avant de les mettre en présence de milieu ultracentrifugé à 100 000 g durant 16h. Ce traitement du milieu permet d'éliminer les vésicules présentes dans le sérum. Le surnageant de culture est ensuite collecté durant 72h en changeant le milieu toutes les 24h.

Les EV sont ensuite purifiées à l'aide d'une série de centrifugations et d'ultracentrifugations. Une première centrifugation du surnageant de culture 5 min à 200 g permet d'éliminer les cellules détachées du tapis cellulaire. Le surnageant de cette première étape est ensuite centrifugé 5 min à 13 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le nouveau surnageant est alors ultracentrifugé 2h à 30 000 g pour sédimenter les microvésicules (MV), puis 2h à 100 000 g pour sédimenter les exosomes (Exo). 200 μ L de PBS sont ajoutés aux culots. Les EV sont remises en suspension une nuit à +4°C et utilisés dans les 10 jours qui suivent la production.

3.2. Avec stimulation par l'ionophore du calcium A23187

Principe

L'ionophore du calcium est une molécule liposoluble, qui transporte des ions Ca^{2+} à travers la membrane. Il est connu pour stimuler la production de microvésicules (§3.2.2.1 p71).

Protocole

Les cellules sont ensemencées en flacons T25 et sont cultivées jusqu'à confluence. Elles sont ensuite incubées 1/2h à 37°C dans un milieu additionné d'ionophore du calcium A23187 (Sigma) à différentes concentrations : 0, 2,5, 5 et 10 μ M. Le surnageant de culture est collecté et purifié selon le protocole précédemment détaillé (§3.1 p107).

4. Caractérisation des EV

4.1. Détermination de la taille des EV par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Principe

La diffusion dynamique de la lumière (DLS : *Dynamic Light Scattering*) repose sur le mouvement brownien des particules. Dans un milieu à viscosité égale, les plus petites particules se déplacent plus vite que les grosses particules (Figure 53). Le déplacement des particules est caractérisé par le coefficient de diffusion de translation (D_T). D'après la loi de Stokes-Einstein, ce coefficient est proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule d_h (Figure 54).

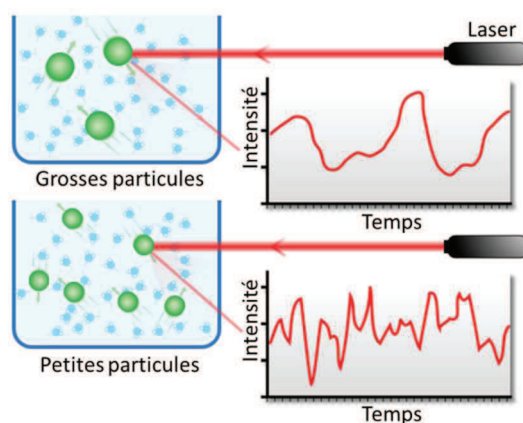


Figure 53. Schéma illustrant l'étude des vésicules à l'aide de leur mouvement brownien (adapté de Wikimedia.org)

$$d_h = \frac{k_b T}{3\pi\eta_0 D_T}$$

k_b la constante de Boltzmann, T la température, η_0 la viscosité du solvant, D_T le coefficient de diffusion et d_h le diamètre hydrodynamique de la particule considérée

Figure 54. Loi de Stokes-Einstein permettant de calculer le diamètre des vésicules par DLS

L'intensité de la lumière ayant traversé l'échantillon est suivie au cours du temps à angle fixe à l'aide d'un spectrophotomètre (658 nm). Une fonction d'autocorrélation permet de suivre le déplacement des particules et ainsi de définir leur taille.

Protocole

200 μ L d'EV préalablement diluées 25 fois dans du PBS sont analysées par DLS 1 min à 15°C à l'aide de l'analyseur Vasco (Figure 55) et du logiciel NanoQ (Cordouan Technologies).

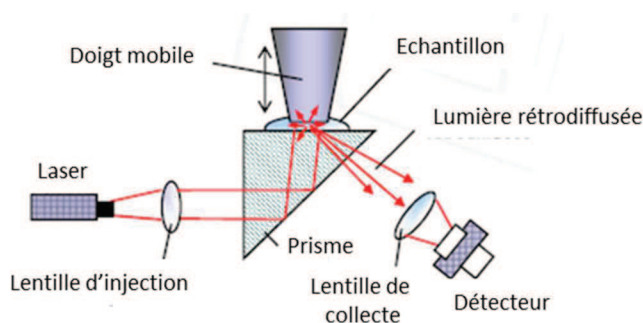


Figure 55. Schéma représentant la technique d'acquisition de données par DLS
Adapté du manuel utilisateur Cordouan

4.2. Estimation de la concentration des EV à l'aide du NanoSight®

Principe

Le NanoSight repose sur le même principe fondamental que le DLS : le suivi individuel de particules à l'aide de leur mouvement brownien (NTA *Nanoparticle Tracking Analysis*). L'amélioration du NanoSight consiste à pouvoir visualiser ce mouvement brownien grâce à un prisme optique qui réfracte le faisceau laser de manière quasiment parallèle à l'échantillon (Figure 56). Ainsi, les particules présentes sur la trajectoire du faisceau laser diffusent la lumière qui est enregistrée à l'aide d'un microscope optique x20 équipé d'une caméra.

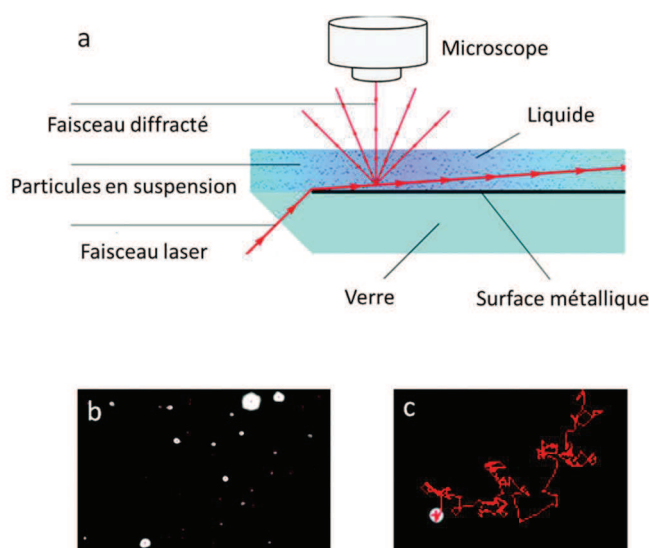


Figure 56. Principe du Nanosight
 a) Schéma de la chambre de mesure b) Image d'une solution de particules
 c) Trajet suivi par une particule. Adapté de (Shang and Gao, 2014)

Protocole

L'appareil utilisé est le Nanosight LM10 (laser 405 nm), équipé d'une caméra CMOS et du logiciel Nanosight NTA 2.3.

La première étape consiste à nettoyer et sécher minutieusement la chambre de mesure. A l'aide d'une seringue, l'échantillon est introduit dans la chambre, laquelle est ensuite placée sous le microscope. La zone de mesure, correspondant à la plus proche du laser, est positionnée sous l'objectif. Le paramètre « gain » est à sa valeur maximale, l'acquisition de la vidéo se fait durant 60 secondes, en prenant soin de ne pas provoquer de vibrations.

Deux paramètres sont à optimiser : 1) la dilution de l'échantillon de manière à être dans une fenêtre de lecture de 10^8 à 10^9 particules/mL. En effet, une concentration trop élevée ou à l'inverse trop faible ne permet pas une mesure statistiquement correcte de l'échantillon. 2) Le seuil de positivité, qui permet à la machine de distinguer le signal du bruit de fond. Les microvésicules étant plus grosses que les exosomes, elles diffusent davantage la lumière, créant des halots qui peuvent être considérés comme des signaux si le seuil de positivité est trop faible. J'ai donc fixé les seuils de positivité à 6 pour les Exo et à 12 pour les MV. Chaque échantillon est analysé six fois.

5. Etude du mécanisme de transfert

5.1. Inhibiteurs métaboliques

Le mécanisme de transfert est étudié à l'aide de drogues inhibant différents processus cellulaires. Leurs concentrations ainsi que leurs impacts sur la cellule sont répertoriés dans le Tableau 8. Les cellules sont cultivées en microplaque à 96 puits jusqu'à 70-80% de confluence puis mises en présence de chacune des drogues durant 1h à 37°C. Les EV sont ensuite ajoutées durant 6h à une dose de 4.10^4 EV/cellule. A la fin du temps d'incubation, les cellules sont rincées au PBS, puis décollées à l'aide de la trypsine (Gibco by Life Technologies) et fixées au paraformaldéhyde 1% une nuit à +4°C. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (§7 p112).

	NOM COMPLET	ACTION	[C] _F	SOLVANT
A	Amiloride	Inhibe le transport d'ions via ENaC, l'échangeur H ⁺ Na ⁺ , et la macropinocytose	1 mM	H ₂ O
BAFA1	Bafilomycine A1	Inhibe l'ATPase vacuolaire (endosome, lysosome), et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes	100 nM	DMSO
CHQ	Chloroquine	Inhibe la lipase lysosomale et prévient la fusion endosome/lysosome et phagosome/lysosome	40 µg/mL	H ₂ O
CHPR	Chlorpromazine	Inhibe la lipase lysosomale et l'endocytose clathrine-dépendante	50 µM	H ₂ O
CYTB	Cytochalasine B	Bloque la polymérisation de l'actine, et l'endocytose clathrine-dépendante	1 µM	DMSO
FIL	Filipine	Inhibe l'endocytose cavéoline-dep	1 µg/mL	DMSO
GEN	Génistéine	Inhibe l'endocytose cavéoline-dep	100 µM	DMSO

Tableau 8. Concentrations et impacts des inhibiteurs métaboliques utilisés pour étudier le mécanisme de transfert des EV

5.2. Effet de la température

L'effet de la température sur l'internalisation des EV a été étudié sur les A549 et les CF15. Les cellules sontensemencées en microplaque à 96 puits puis incubées 2h avec les EV à une dose de 4.10^4 EV/cellule et ce à différentes températures : 4°C, 22°C ou 37°C. Elles sont ensuite lavées au PBS puis décollées à l'aide de la trypsine et fixées une nuit dans du paraformaldéhyde 1% (PBS) avant d'être analysées par cytométrie en flux.

6. Transfert de CFTR d'un type cellulaire à un autre : cas des neutrophiles

Afin d'étudier le transfert potentiel de CFTR d'une cellule épithéliale pulmonaire à un neutrophile, nous avons réalisé une expérience préliminaire de co-culture. Dans le but d'identifier *a posteriori* ces deux types cellulaires, nous avons utilisé les A549 transduites par l'Ad5-GFP-CFTR (§1.1.2.2 p93) qui rend les cellules épithéliales fluorescentes vertes, et nous avons marqué les neutrophiles (HL60) à l'aide d'un colorant violet (Violet cell Prolifération Dye 450 BD Horizon™) (Figure 57). 1.10^6 HL60 ont été resuspendues dans 1 mL de PBS contenant 1 μ L de VPD450 pour une concentration finale de 1 μ M. La suspension cellulaire est incubée 15 min à 37°C puis 9 volumes de PBS sont ajoutés afin d'éliminer l'excédent de marqueur. Après une centrifugation 5 min à 1 200 g pour sédimenter les cellules, 10 mL de milieu complet sont ajoutés. Une nouvelle centrifugation est réalisée et le culot est repris dans 1 mL de milieu pour être déposé sur les A549 préalablement transduites par l'Ad5-GFP-CFTR (MOI 50). Après 48h, le surnageant de culture est analysé par cytométrie en flux (§7 p112). Les cellules mortes sont exclues de l'analyse grâce à un colorant fluorescent rouge Draq7 (Beckman Coulter) qui se fixe uniquement sur les acides nucléiques des cellules mortes.

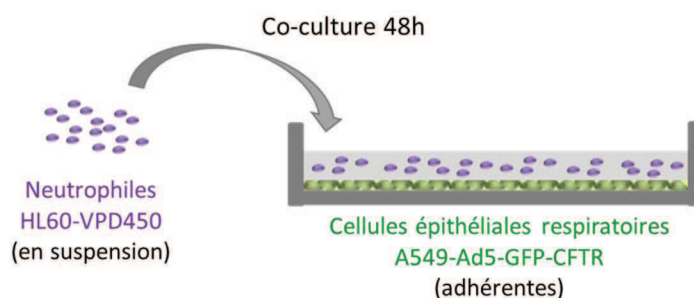


Figure 57. Coculture de neutrophiles et de cellules épithéliales respiratoires

7. Cytométrie en flux

Principe :

La cytométrie en flux permet de caractériser des vésicules ou des cellules de façon individuelle et selon diverses caractéristiques telles que la taille, la granulosité, ainsi que la fluorescence. Les cellules sont entraînées dans un liquide de gaine et passent une à une devant un laser. La lumière réémise est envoyée vers divers photomultiplicateurs, ce qui permet d'analyser plusieurs longueurs d'onde différentes en même temps et donc de suivre plusieurs éléments d'intérêt sur un même échantillon (Figure 58). En utilisant un appareil capable de trier les cellules, il est également possible de séparer différentes populations pour étudier et comparer par la suite d'autres caractéristiques.

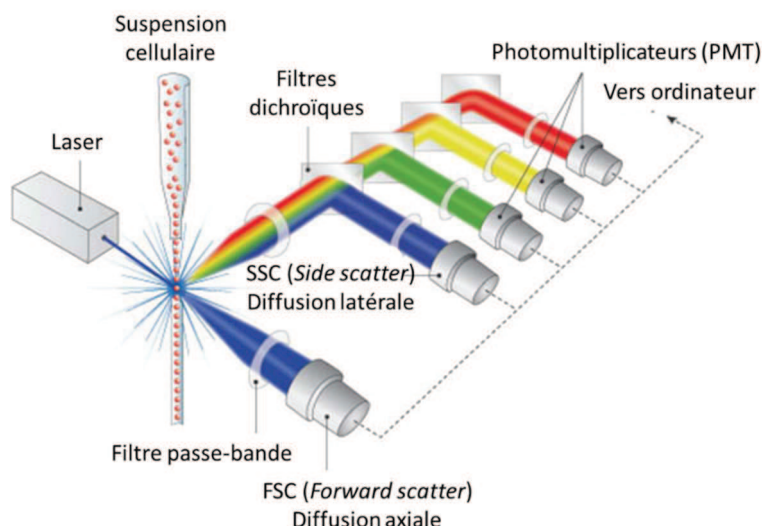


Figure 58. Schéma illustrant le principe de la cytométrie en flux
Adapté de <http://flowcytometry.med.ualberta.ca/>

Protocole pour la cytométrie en flux de cellules

Les cellules sont cultivées en microplaque à 48 ou 96 puits lors des études de transfert ou de mécanisme (§5 p111), de manière à obtenir 70 à 80% de confluence lors du dépôt des EV. A la fin de l'expérience, elles sont détachées de leur support grâce à une incubation de 10 min à 37°C avec de la trypsine 0,05% (Invitrogen). Elles sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde, à une concentration finale de 1%. Elles sont analysées dans les trois jours qui suivent la fixation, à l'aide du cytomètre en flux FACS Calibur (BD Biosciences) et du logiciel CellQuestPro.

Les cellules HL60 issues de la coculture avec les A549-Ad5-GFP-CFTR (§6 p112) sont analysées à l'aide du cytomètre Gallios (Beckman Coulter) équipé d'un laser violet, et des logiciels d'acquisition et d'analyse Kaluza G (version 1.0) et Kaluza analysis (version 1.3) (Beckman Coulter).

Protocole pour la cytométrie en flux d'EV

Les EV se resuspendent dans 200 µL de PBS durant une nuit à +4°C. Elles sont ensuite analysées à l'aide du cytomètre en flux LSR II (BD Biosciences) et du logiciel DIVA. L'acquisition est réalisée en vitesse lente. Pour les essais de tests de marquage des EV, l'acridine orange et l'annexine V, couplés à l'Alexa-Fluor 647 (Life Technologies), ont été utilisés. L'acridine orange marque les acides nucléiques, elle est utilisée à une concentration de 15 µg/mL. L'annexine V se lie aux phosphatidylsérines présentes à la surface des EV. 5 µL sont ajoutés à 100 µL de suspension d'EV, l'analyse par cytométrie en flux est réalisée après 15 min d'incubation à température ambiante. Enfin, pour l'étude de l'effet de l'ionophore A23187, 40 µL de suspension d'EV ont été analysés à l'aide du cytomètre Accuri C6 (BD Biosciences), à une vitesse de 20 µL/min.

Protocole pour le tri cellulaire

2 à 3 mL de suspension cellulaire à une concentration de 10 à 15 millions de cellules/mL sont nécessaires pour réaliser un tri cellulaire. Les HEK-293-GFP-CFTR GFP-positives ont été triées après un mois de culture à l'aide du cytomètre en flux FACS Aria (BD Biosciences) (§1.2 p134).

8. Tests de fonctionnalité du CFTR

8.1. Sonde DiSBAC₂(3)

Principe

La sonde DiSBAC₂(3) (Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) trimethine oxonol) est une sonde fluorescente (λ_{exc} 530, λ_{em} 560) sensible au potentiel de membrane. Elle suit l'équilibre de Nernst, c'est-à-dire qu'elle s'équilibre de part et d'autre de la membrane, ici en fonction du potentiel de membrane. Lorsque les cellules se dépolarisent, la sonde entre dans les cellules, et à l'inverse, elle sort dans le milieu extracellulaire lorsqu'elles sont hyperpolarisées. La première étape (Figure 59 A) consiste donc à établir l'équilibre en incubant les cellules dans le DiSBAC₂(3). Une fois que l'équilibre est atteint, la solution extracellulaire est remplacée par une solution contenant du DiSBAC₂(3) pour ne pas rompre cet équilibre, ainsi que du sodium gluconate à la place du NaCl de manière à créer un gradient d'ions chlorure favorable à leur sortie, sans modifier le potentiel de membrane (Figure 59 B). La présence d'activateurs du CFTR dans ce milieu aura pour conséquence la sortie d'ions chlorure, ce qui entraînera une dépolarisation de la membrane et par conséquent l'entrée de DiSBAC₂(3) dans les cellules (Figure 59 C). Le DiSBAC₂(3) se fixe alors aux protéines intracellulaires ou encore aux membranes, ce qui a pour conséquence une émission accrue de fluorescence. Ainsi, une augmentation de fluorescence des cellules témoigne de la sortie d'ions chlorure par le canal CFTR, validant sa présence et sa fonctionnalité.

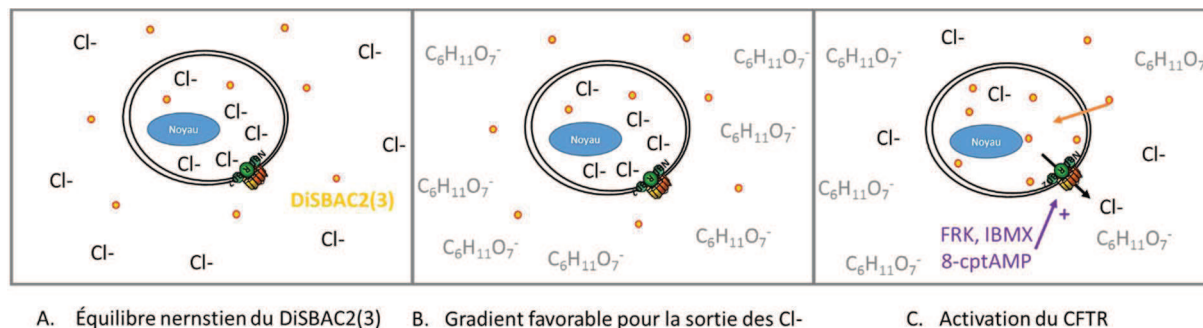


Figure 59. Schéma illustrant le principe du test de fonctionnalité du CFTR par l'utilisation de la sonde DiSBAC₂(3)

Protocole

Les cellules, cultivées sur lamelles de verre de 1 cm de diamètre, sont ici analysées après mise en contact des EV et des cellules pendant 72h. Tout d'abord, elles sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution contenant 100 nM de DiSBAC₂(3). Cette solution dite « normal chloride » contient : 136 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 1mM de MgCl₂, 2,5 mM de glucose, et 5 mM d'Hepes (pH 7,4). Elles sont ensuite perfusées avec une solution dite « low chloride » où le NaCl est remplacé par du gluconate de sodium. Cette solution contient également des activateurs du CFTR : 200 μ M de dibutyryl-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (dibutyryl-cAMP), 200 μ M de (4-chlorophenylthio)-cAMP, 20 μ M de forskoline et 50 μ M de 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). Les cellules sont observées avec un microscope inversé (TMD300, Nikon AG, Kürsnacht, Switzerland), équipé d'une caméra CCD (CoolSNAP HQ2 CCD camera, Visitron Systems GmbH,

Puchheim, Germany). Le DiSBAC₂(3) est excité à 546 nm avec une lampe xénon 100 W et la lumière émise est collectée à travers un filtre 580 nm. Les images sont capturées toutes les 10 secondes à l'aide du logiciel Metafluor version 8.01 (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). Les régions d'intérêt sont définies et contiennent 20 à 30 cellules. Les changements de fluorescence sont exprimés à l'aide du rapport F_t/F_0 , où F_t est la fluorescence à un temps t , et F_0 la fluorescence de départ. 20 μ M de GlyH101, un composé glycinyl hydrone, est utilisé comme inhibiteur spécifique du CFTR. Le protocole utilisant le DiSBAC₂(3) a été précédemment publié dans l'équipe du Pr Marc Chanson (Coclet-Ninin et al., 2002).

8.2. Microvoltmétrie

Principe

La fonction principale de la protéine CFTR est celle de canal à ions chlorure (Cl^-) (§2.3.2.4.1 p47). Lorsqu'il est activé, le CFTR expulse les ions Cl^- hors de la cellule. Cette propriété est utilisée pour tester la fonctionnalité du CFTR. Couramment, lors de ces tests, les ions chlorure sont remplacés par les ions iodures (I^-), qui suivent le même trafic que les Cl^- à travers le CFTR, mais ont une période plus courte ($t_{1/2}^{125\text{I}} = 60$ jours, $t_{1/2}^{36\text{Cl}} = 301\,000$ ans). Le test décrit ici consiste à charger les cellules en NaI, puis à mesurer la sortie d'ions I^- après ajout d'activateurs spécifiques du CFTR. Une augmentation d'ions I^- dans le milieu extracellulaire témoigne de la présence et de la fonctionnalité du CFTR (Figure 60). Dans cette expérience, nous n'utilisons pas de radioactivité, les ions I^- sont détectés à l'aide d'une microélectrode spécifique. Il est tout de même intéressant de conserver les ions I^- puisque l'électrode spécifique des ions I^- est plus sensible que celle spécifique des ions Cl^- ($\text{Cl}^- : 5 \cdot 10^{-6}$ à 1 M, $\text{I}^- : 5 \cdot 10^{-8}$ à 1 M, <http://www.shelfscientific.com>). Par ailleurs, ce test permet d'évaluer la fonctionnalité de la protéine CFTR sur l'ensemble des cellules traitées.

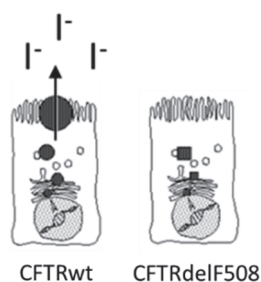


Figure 60. Schéma illustrant le principe du test de fonctionnalité du CFTR par sortie d'ions iodure

Procotole

Les cellules sont cultivées en microplaque à 6 puits de manière à être confluentes le jour du test de fonctionnalité. Elles sont tout d'abord rincées trois fois avec 2 mL de tampon de chargement qui contient 136 mM de NaI, 3 mM de KNO_3 , 2 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 20 mM d'Hepes, 11 mM de glucose, tamponné à 7,4 avec 1M de NaOH, puis incubées 1 h à 37°C avec ce même tampon. Les ions iodure s'équilibrent alors de part et d'autre de la membrane plasmique. Une série de 15 lavages de 1 mL est ensuite effectuée avec du tampon de sortie, qui contient du NaNO_3 à la place du NaI, de manière à éliminer les ions iodure extracellulaires. Un lavage supplémentaire est effectué sur une durée d'une minute. Les surnageants sont ensuite collectés dans une microplaque à 48 puits puis remplacés par un

volume équivalent. L'opération est répétée à raison de 1 mL par puits et par minute (Figure 61 A). Il est très important de ne pas laisser sécher les cellules, il convient donc d'aspirer le surnageant d'un puits, puis de remettre immédiatement du tampon dans ce puits. Le travail ambidextre est donc de rigueur pour traiter plusieurs échantillons en même temps (Figure 61 B.a). Les quatre premiers points collectés constituent la ligne de base. Les huit points suivants sont réalisés à l'aide de tampon de sortie additionné des activateurs du CFTR : 10 μ M de forskoline, 100 μ M de dibutyryl-AMPc et 1mM d'IBMX. Enfin, un dernier point est collecté avec du tampon de sortie contenant 0,1 % de NP-40. Ce dernier point permet de lyser les cellules, ce qui a pour effet de libérer les ions iodure restants, et de s'assurer que les cellules ont été correctement chargées. La présence d'ions iodure dans le milieu extracellulaire est ensuite mesurée à l'aide d'une microélectrode spécifique des ions iodure (LIS-146ICM Micro Iodide Ion Electrode, Lazar Research Laboratories), reliée à un pH-mètre capable de mesurer les mV (Model 62 ORP, Jenco Instruments Inc.) (Figure 61 B.b). La mesure obtenue est convertie en concentration ionique à l'aide d'une gamme étalon établie avec des concentrations en I^- allant de 10^{-1} à 10^{-8} M. Le protocole utilisant la microélectrode a été précédemment publié par l'équipe de John Riordan (Aleksandrov et al., 2010).

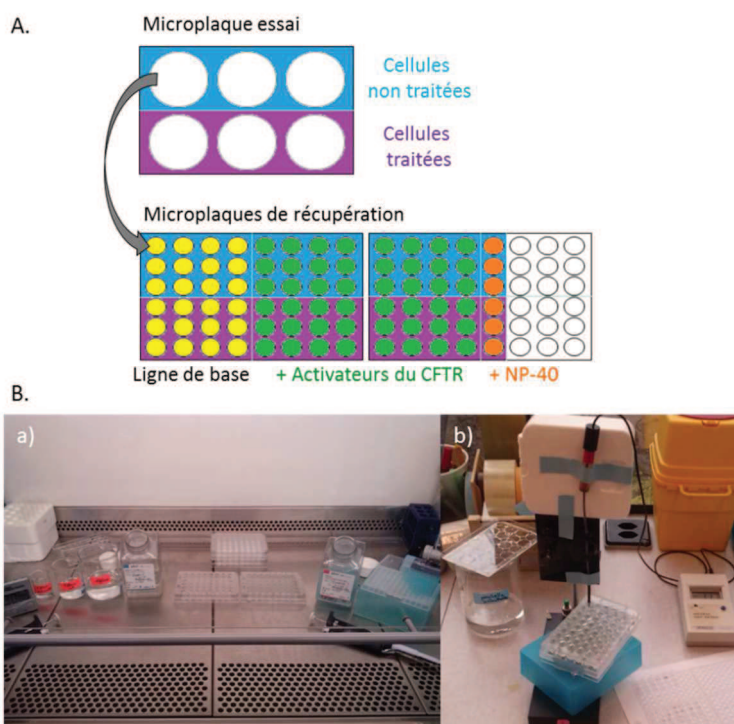


Figure 61. Illustrations du protocole mis au point pour le test de fonctionnalité de la protéine CFTR par microvoltmétrie
 A. Plan de la microplaque utilisée pour l'essai et des microplaques de récupération des différents points de la cinétique.
 B. Organisation des postes de travail : a) pour le travail ambidextre et b) pour la lecture des plaques

9. Techniques de microscopie

9.1. Microscopie confocale

Principe

Un microscope confocal permet de réaliser des images d'échantillons fluorescents avec une très faible profondeur de champ (environ 400 nm). Il a en effet la particularité de posséder un diaphragme

nommé pinhole, placé dans le trajet de fluorescence émise par l'échantillon (Figure 62). Les signaux provenant des couches supérieures et inférieures du plan focal de l'échantillon sont ainsi stoppés, générant une image nette que l'on appelle section optique. La superposition de plusieurs images obtenues en faisant varier le plan focal permet par ailleurs d'obtenir une image trimentionnelle de l'échantillon.

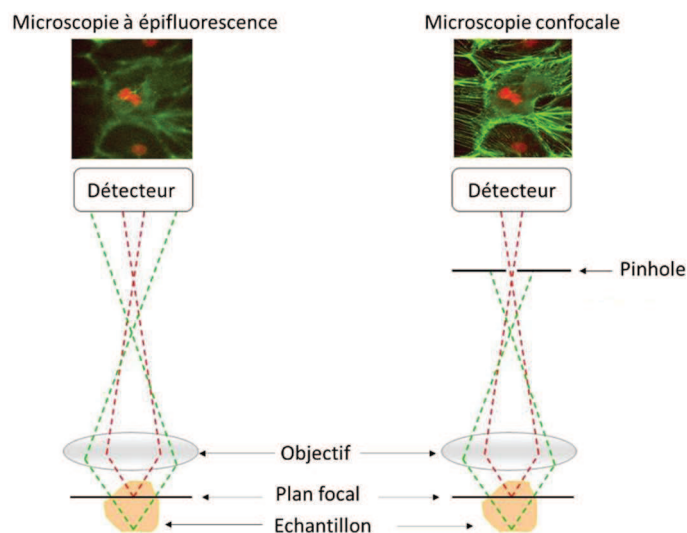


Figure 62. Schéma illustrant le principe du microscope confocal
Adapté de <http://www.cptp.inserm.fr/imagerie-cellulaire>

Protocole

Les cellules d'intérêt sont cultivées en Lab-Tek 8 puits. Entre chacune des étapes du protocole suivant, deux rinçages sont effectués à l'aide de 400 μ L de PBS. Les cellules sont tout d'abord fixées à l'aide de paraformaldéhyde 1% (Sigma) une nuit à +4°C, puis perméabilisées avec 400 μ L de Triton 0,1% (PBS) (Sigma) durant 10 min à température ambiante (RT). Le blocage des sites d'interaction non spécifique entre la membrane et les anticorps est ensuite réalisé en incubant les cellules 1h à RT en présence d'une solution de BSA 1% (PBS). Afin de marquer différents compartiments vésiculaires, les anticorps primaires monoclonaux dirigés contre Rab5 (clone C8B1, Cell Signaling), Rab4a (D-20, Santa Cruz Biotech), Rab11 (clone H-87, Santa Cruz Biotech), et Lamp-1 (CD107a, clone H4A3 (BD Pharmingen) ont été utilisés durant 1h à RT aux dilutions recommandées par le fabricant (100^{ème} pour Rab5 et 200^{ème} pour les autres anticorps). Les cellules sont ensuite incubées 1h à RT avec l'anticorps secondaire "Alexa-Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG" (Molecular Probes, Invitrogen) dilué au 1 000^{ème}. Elles sont ensuite placées en présence de DAPI (Euromedex) 10 μ g/mL durant 10 min à température ambiante afin de marquer les noyaux. Deux nouveaux rinçages sont effectués avant de retirer les chambres et d'effectuer le montage entre lame et lamelle grâce au liquide de montage Fluoromount-G (Southern Biotech) et en prenant soin d'éviter les bulles d'air. Les lames sont préservées de la lumière pour éviter le photoblanchiment des échantillons. Les observations des cellules donneuses ont été effectuées avec le microscope à épifluorescence Axiovert 135 (Zeiss). Les cellules cibles ont été observées à l'aide de l'AxiomagerZ1 (Carl Zeiss), ainsi que du microscope confocal LSM710 (Carl Zeiss) et analysées avec le logiciel Zen software (Carl Zeiss).

9.2. Image Stream X

L'Image Stream X (ISX) (Amnis) est un nouvel appareil d'acquisition des données couplant un cytomètre en flux à un microscope à épifluorescence. Les logiciels d'acquisition des données et d'analyse sont respectivement Inspire et Ideas. L'acquisition des données a été réalisée avec l'objectif x60 et en fluidique lente (low).

9.3. Microscopie électronique

Principe

La microscopie électronique permet d'obtenir des images très résolutive, avec une limite de résolution de l'ordre de 0,2 nm à 2 nm, contre 1 µm pour les microscopes photoniques classiques. Les échantillons sont placés dans un vide poussé et sont soumis à un faisceau parallèle d'électrons. Selon la densité de l'échantillon, les électrons traversent ou non la préparation, créant une image recueillie à l'aide d'une caméra numérique.

Protocole

Coloration négative : Les échantillons d'EV ont été déposés sur une grille métallique recouverte d'une membrane de collodion et colorés négativement à l'aide d'acétate d'uranyl 2%.

Coupes ultrafines : Les échantillons de cellules incubées avec les EV ont tout d'abord été fixés à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde 2% en tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4, ce qui permet de figer les structures cellulaires. Ils subissent ensuite une post-fixation à l'osmium (tétroxyde d'osmium 1% en tampon cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,4). Les échantillons sont ensuite déshydratés à l'aide de bains successifs d'alcool de plus en plus concentrés, puis inclus dans une résine époxyde Epon, afin de pouvoir faire des coupes ultrafines à l'aide d'un ultramicrotome. Le contraste est ensuite réalisé grâce à des sels de métaux lourds, 7% d'acétate d'uranyle (méthanol) puis 2,6% de citrate de plomb (H₂O). Les échantillons sont enfin observés à l'aide du microscope électronique JEM-1400 Jeol équipé d'une caméra digitale Orius-Gatan.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

Partie I

Preuve de concept
en cellules de hamster

Notre thèse a débuté avec la validation de la preuve de concept du transfert fonctionnel de matériel biologique CFTR à des cellules cibles modèles par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires. Ce travail a été effectué sur des cellules de hamster, les CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) (§1.1.2.1 p93), qui présentent un phénotype épithélial et qui n'expriment pas d'équivalent humain du CFTR de manière constitutive. Les CHO ont été transfectées par le plasmide pCEP4-GFP-CFTR. La séquence EBNA1/OriP de ce plasmide permet son maintien épisomal dans les cellules et sa réplication synchrone de la division cellulaire. Ainsi, il confère potentiellement aux cellules CHO transfectées une expression stable et à long terme de la protéine de fusion GFP-CFTR. Afin de valider les CHO-GFP-CFTR comme cellules donneuses d'EV pour notre étude, il convient de vérifier qu'elles expriment bien la protéine d'intérêt et que celle-ci est correctement orientée à la membrane des cellules et fonctionnelle en tant que canal à ions chlorure.

Grâce à la fluorescence de la GFP, une observation des cellules CHO-GFP-CFTR au microscope à épifluorescence suggère tout d'abord la présence de la protéine de fusion à la membrane plasmique et dans le cytoplasme des cellules (Figure 63 A). Une expérience de cytométrie en flux utilisant un anticorps dirigé contre l'ectodomaine du canal CFTR a révélé 70% de cellules CFTR-positives (Figure 63 B) et confirme la présence de la protéine CFTR correctement orientée à la membrane des cellules.

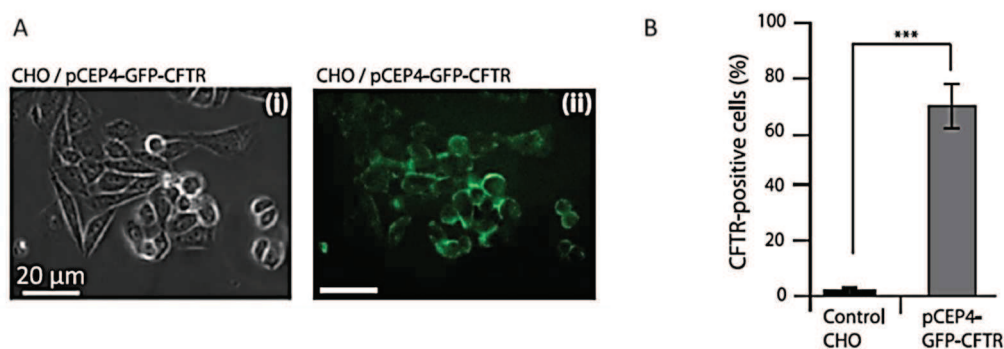


Figure 63. Caractéristiques des cellules CHO-GFP-CFTR donneuses d'EV
A. Images de microscopie (i) en contraste de phase et (ii) à épifluorescence
B. Réactivité à l'anticorps anti-CFTR dirigé contre l'ectodomaine

Afin de vérifier que le CFTR présent à la membrane des cellules CHO-GFP-CFTR est fonctionnel en tant que canal à ions chlorure, un test de fonctionnalité a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du Pr Marc Chanson de l'université de Genève. Ce test utilise une sonde fluorescente et sensible au potentiel de membrane (§8.1 p114). La sonde nommée DiSBAC2(3) entre dans les cellules lorsqu'elles se dépolarisent et inversement. CFTR étant un canal qui expulse les ions chlorure, son activation se traduit par une entrée de la sonde fluorescente dans la cellule. Un microscope à fluorescence couplé à une caméra permet de suivre en temps réel l'apparition ou la disparition de la fluorescence dans les cellules. La technique permet d'analyser un champ de 20 à 30 cellules en monocouche. Le signal est représenté par le rapport F_t/F_0 où F_t représente la fluorescence à un temps t et F_0 la fluorescence au temps 0. Le test de fonctionnalité réalisé sur les CHO-GFP-CFTR montre une augmentation de fluorescence, plus modeste que celle obtenue avec les cellules témoins, mais tout de même significative (Figure 64). La protéine de fusion présente à la membrane des cellules est donc fonctionnelle en tant que canal à ions chlorure, validant les CHO-GFP-CFTR comme possibles cellules donneuses d'EV.

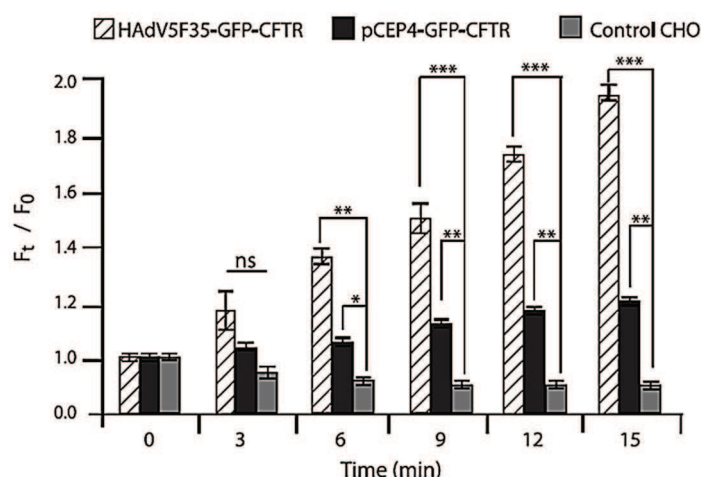


Figure 64. Fonctionnalité de la protéine CFTR mesurée à l'aide du test utilisant le DiSBAC₂(3)

Les vésicules extracellulaires libérées par ces cellules ont été isolées par ultracentrifugation à 30 000 puis à 100 000 g conduisant respectivement à deux populations : une contenant les MV nommée MP₃₀, et une contenant les Exo nommée MP₁₀₀. Dans le but de les caractériser, chacune de ces populations a été fractionnée en trois sous-populations de différentes densités grâce à une nouvelle ultracentrifugation réalisée en gradient continu de sucrose. Les trois sous-populations d'EV nommées HD (haute densité, $\rho = 1,18 - 1,25$), ID (densité intermédiaire, $\rho = 1,14 - 1,18$) et LD (basse densité, $\rho = 1,06 - 1,14$) ont été analysées par cytométrie en flux et par qRT-PCR. De manière intéressante, les fractions HD contiennent plus de protéine et moins d'ARNm GFP-CFTR que les fractions de plus faible densité (Tableau 9). Par ailleurs, les MV semblent contenir plus de protéine d'intérêt que les Exo, à raison de 10,3% d'EV fluorescentes vertes contre 3,6% en moyenne. De manière générale, les résultats montrent la présence de protéine et d'ARNm GFP-CFTR dans toutes les fractions.

Density subclass	GFP(+) MP ₃₀ (% total MP)	GFP(+) MP ₁₀₀ (% total MP)	GFP-CFTR RNA in MP ₃₀	GFP-CFTR RNA in MP ₁₀₀
LD ($\rho_m = 1.10$)	6.2±2.5	1.4±0.4	82.5±14.3	97.7±77.0
ID ($\rho_m = 1.16$)	10.4±1.7	1.2±1.2	61.6±35.2	44.0±32.3
HD ($\rho_m = 1.21$)	14.5±3.2	8.3±2.1	51.3±30.7	60.5±22.5

Tableau 9. Proportions de protéines GFP+ et quantités d'ARNm GFP-CFTR détectées dans les EV produites par les CHO-GFP-CFTR

Les EV ainsi caractérisées ont été mises au contact de cellules CHO cibles, non transfectées par le plasmide pCEP4-EGFP-CFTR et n'exprimant donc pas la protéine de fusion de manière constitutive.

L'internalisation des EV est suivie au cours du temps par cytométrie en flux, grâce à la fluorescence de la GFP fusionnée au canal CFTR (Figure 65). Les résultats montrent des cinétiques similaires entre les différentes sous-classes de densité. Pour les cellules traitées par les MP₃₀, un signal GFP+ est détectable dans 4 à 6% des cellules cibles dès 2h et ce jusqu'à 8h. Ce signal augmente ensuite progressivement jusqu'à atteindre 73 à 83% des cellules cibles à 5 jours. Pour les cellules traitées par les MP₁₀₀, une cinétique similaire est observée, jusqu'à atteindre 57 à 76% de cellules cibles GFP+ à 5 jours. Ces résultats en deux phases suggèrent que la protéine est transférée à un faible nombre de cellules dans un premier temps, puis que la néosynthèse de protéine à partir d'ARNm transféré prend le relais et

concernerait cette fois-ci la majorité de la population cellulaire. Cette hypothèse est confortée par la présence d'ARNm dans les cellules cibles des EV (Figure 66).

La même expérience a été réalisée en suivant cette fois-ci la protéine CFTR grâce à un anticorps dirigé contre l'ectodomaine révélé par un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa-568 (Figure 67). Les résultats témoignent de l'insertion correcte de la protéine d'intérêt dans la membrane plasmique. Le signal maximal est obtenu 2 à 3 jours après incubation des cellules cibles avec les EV. Il concerne 50 à 60% des cellules traitées par les MP₃₀ et 60 à 70% des cellules traitées par les MP₁₀₀. Contrairement au signal GFP, le signal CFTR diminue après 3 jours, semblant témoigner de l'internalisation du CFTR. Des études de microscopie confocale ont confirmé la présence de signal fluorescent dans des compartiments vésiculaires intracytoplasmiques.

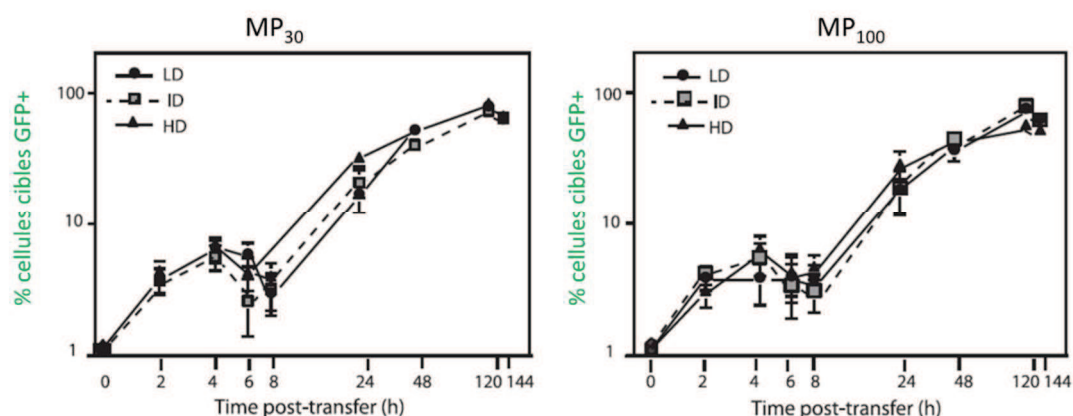


Figure 65. Cinétique d'apparition de signaux GFP+ dans les cellules traitées par les EV CHO-GFP-CFTR

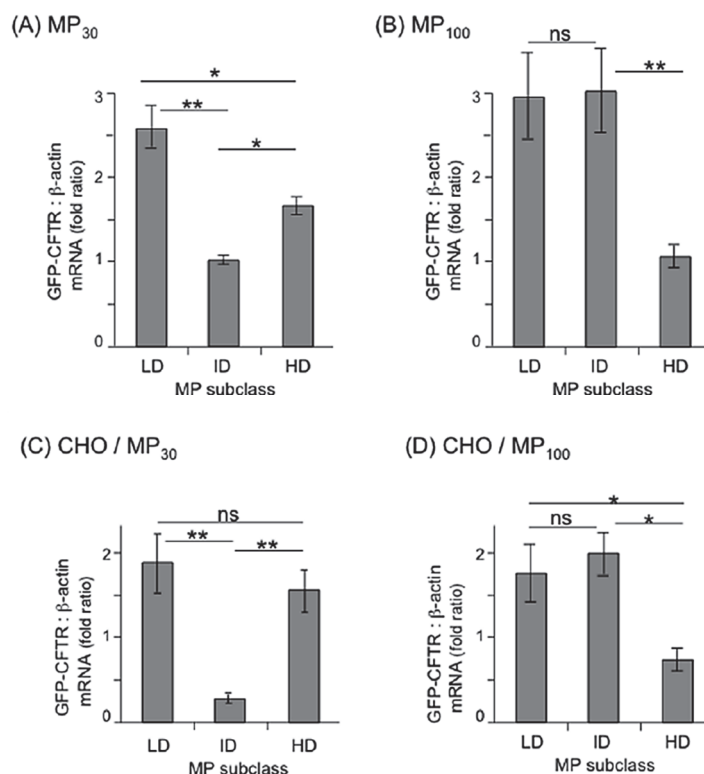


Figure 66. Détection d'ARNm GFP-CFTR dans les EV CHO-GFP-CFTR (A et B) et dans les cellules cibles des EV (C et D)
 HD, ID et LD correspondent aux fractions de différentes densités : HD haute densité, $p = 1,18 - 1,25$, ID densité intermédiaire, $p = 1,14 - 1,18$ et LD basse densité, $p = 1,06 - 1,14$

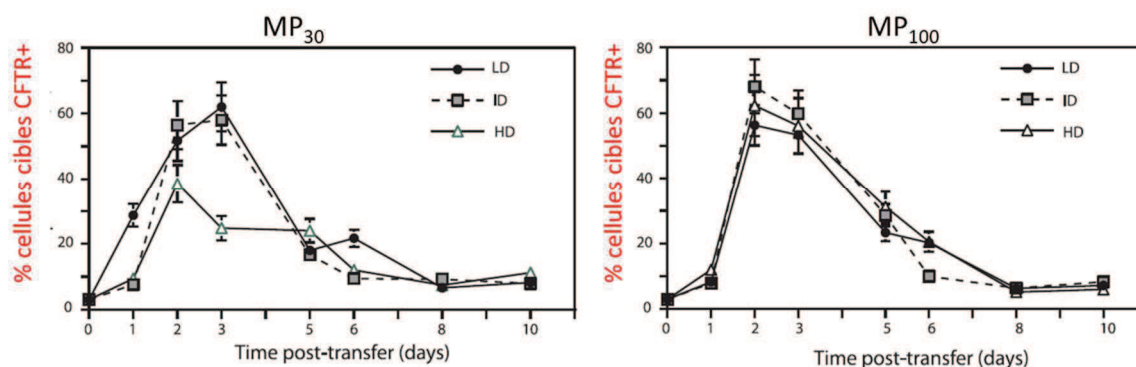


Figure 67. Cinétique d'apparition de signaux CFTR+ dans les cellules traitées par les EV CHO-GFP-CFTR
Les MP30 et les MP100 correspondent respectivement aux fractions contenant les MV et les Exo

Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine GFP-CFTR détectée à la membrane plasmique aux temps tardifs, le test utilisant la sonde DiSBAC2(3) a été mis en œuvre sur des cellules CHO, 72h après incubation avec les EV CHO-GFP-CFTR. Ce temps correspond en effet au maximum d'immunoréactivité de la protéine CFTR détectée dans les cellules cibles. Les résultats sont présentés Figure 68. L'entrée de la sonde dans les cellules est traduite par le rapport F_t/F_0 où F_t représente la fluorescence à un temps t et F_0 la fluorescence au temps 0. Des images clés ont été choisies afin d'illustrer les différentes phases de la cinétique (a-d). Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors de l'ajout d'un cocktail d'activateurs du CFTR dans le milieu (I). Une diminution de l'intensité de fluorescence est ensuite observée lors de l'ajout de l'inhibiteur du CFTR nommé GlyH101 (II), confirmant la spécificité du signal. Enfin, un nouvel ajout d'activateurs montre que ce phénomène est réversible (III). Les protéines présentes dans les cellules cibles des EV CHO-GFP-CFTR sont donc fonctionnelles en tant que canal à ions chlorure. Ceci valide la preuve de concept du transfert fonctionnel de CFTR. Ces résultats ainsi que ceux précédemment obtenus avec les protéines CAR et CD46 ( I.B p85) ont fait l'objet d'une publication présentée ci-après (Gonzalez et al., 2012).

Il est à noter que le test utilisant la sonde DiSBAC2(3) ne nous a pas permis de conclure quant à la fonctionnalité de la protéine GFP-CFTR présente dans les cellules cibles aux temps pr coc s. Cependant, nous ne savons pas si cela est dû à un défaut de conformation de la protéine ou bien à un défaut de seuil. Le faible nombre de cellules transduites peut en effet être à l'origine d'un signal trop faible pour être détecté. Afin de répondre à cette question, il serait intéressant d'utiliser la technique de patch clamp, qui permet d'enregistrer les courants ioniques à partir d'une cellule unique.

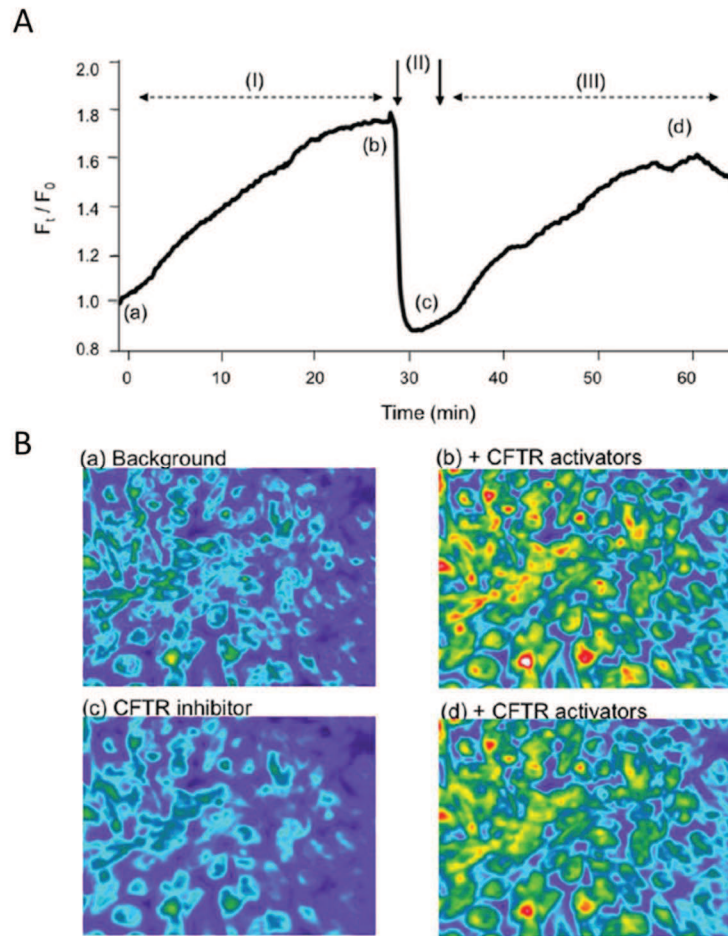


Figure 68. Test de fonctionnalité de la protéine CFTR présente dans les cellules cibles des MP₁₀₀-CHO-GFP-CFTR à 72h p.t.
A. Cinétique d'apparition du signal fluorescent ; B. Images clés illustrant les différentes phases de la cinétique (a-d).

Microparticle-Mediated Transfer of the Viral Receptors CAR and CD46, and the CFTR Channel in a CHO Cell Model Confers New Functions to Target Cells

Gaëlle Gonzalez¹, Cyrielle Vituret^{1,2}, Attilio Di Pietro², Marc Chanson³, Pierre Boulanger¹, Saw-See Hong^{1,4*}

1 Université Lyon 1, UCBL-INRA-EPHE UMR-754, Retrovirus & Comparative Pathology, Lyon, France, **2** Equipe labellisée Ligue 2009, Unité BM2SI, UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (FR 3302), Lyon, France, **3** Laboratory of Clinical Investigation III, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Geneva University Hospitals and University of Geneva, Foundation for Medical Research, Geneva, Switzerland, **4** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France

Abstract

Cell microparticles (MPs) released in the extracellular milieu can embark plasma membrane and intracellular components which are specific of their cellular origin, and transfer them to target cells. The MP-mediated, cell-to-cell transfer of three human membrane glycoproteins of different degrees of complexity was investigated in the present study, using a CHO cell model system. We first tested the delivery of CAR and CD46, two monospanins which act as adenovirus receptors, to target CHO cells. CHO cells lack CAR and CD46, high affinity receptors for human adenovirus serotype 5 (HAdV5), and serotype 35 (HAdV35), respectively. We found that MPs derived from CHO cells (MP-donor cells) constitutively expressing CAR (MP-CAR) or CD46 (MP-CD46) were able to transfer CAR and CD46 to target CHO cells, and conferred selective permissiveness to HAdV5 and HAdV35. In addition, target CHO cells incubated with MP-CD46 acquired the CD46-associated function in complement regulation. We also explored the MP-mediated delivery of a dodecaspanin membrane glycoprotein, the CFTR to target CHO cells. CFTR functions as a chloride channel in human cells and is implicated in the genetic disease cystic fibrosis. Target CHO cells incubated with MPs produced by CHO cells constitutively expressing GFP-tagged CFTR (MP-GFP-CFTR) were found to gain a new cellular function, the chloride channel activity associated to CFTR. Time-course analysis of the appearance of GFP-CFTR in target cells suggested that MPs could achieve the delivery of CFTR to target cells via two mechanisms: the transfer of mature, membrane-inserted CFTR glycoprotein, and the transfer of CFTR-encoding mRNA. These results confirmed that cell-derived MPs represent a new class of promising therapeutic vehicles for the delivery of bioactive macromolecules, proteins or mRNAs, the latter exerting the desired therapeutic effect in target cells via *de novo* synthesis of their encoded proteins.

Citation: Gonzalez G, Vituret C, Di Pietro A, Chanson M, Boulanger P, et al. (2012) Microparticle-Mediated Transfer of the Viral Receptors CAR and CD46, and the CFTR Channel in a CHO Cell Model Confers New Functions to Target Cells. PLoS ONE 7(12): e52326. doi:10.1371/journal.pone.0052326

Editor: Bin He, Baylor College of Medicine, United States of America

Received: August 23, 2012; **Accepted:** November 12, 2012; **Published:** December 20, 2012

Copyright: © 2012 Gonzalez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work in Lyon was financed by the Cystic Fibrosis French Association (VLM Contract GT2009-2010-2011). The work in Geneva was supported by grant #310030_134907/1 from the Swiss Science Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: saw-see.hong@univ-lyon1.fr

Introduction

The extracellular milieu contains a vast family of cell-derived, particulate elements which are heterogenous in size, depending upon the shedding process, cell type and cellular compartments from which they are issued. According to the most recent and generally accepted definition, extracellular microparticles (MPs) are membrane-derived vesicles with diameter ranging from 100 to 500 nm, which are released from virtually all cell types (reviewed in [1–5]). Extracellular release of MPs occurs in response to certain stress conditions [6,7] or pathological processes [8–10]. However, MPs have also been shown to be released spontaneously and physiologically, and are now considered as key elements in the cell-to-cell communications [3,11–13]. This include angiogenesis [14], blood coagulation [15,16], infection by HIV-1 [17] and other viruses [4], carcinogenesis [18], inflammation [19], vaccinology [20], and more generally in immunity [8,21–23]. One particular

case of MP contribution to immunological processes has been termed ‘troglitosis’ [24,25].

In general, MPs carry with them membrane and cytosolic components specific of their cellular origin [26], including proteins and nucleic acids, such as mRNAs and microRNAs [7,11,27–30], and are capable of transferring their cargo to recipient cells [16,29,31–34]. During their extracellular release, MPs can also embark components which are foreign to the cells, such as nucleic acids, proteins or glycoproteins expressed transiently or constitutively by a plasmid or viral vector. The latter scenario is reminiscent of the process of virus or virus-like particles (VLPs) pseudotyping by foreign glycoproteins [35–40]. MPs are not only considered as circulating biomarkers for the molecular profiling of certain cancers [41], but their therapeutic potential as conveyors of bioactive factors, proteins, RNAs including miRNAs, is being evaluated for personalized medicine and for the treatment of a number of diseases and cellular dysfunctions [5,7,9,11,27,30,42].

In the present study, we developed a cellular model using Chinese hamster ovarian cells (CHO) to analyse the MP-mediated transfer of three human transmembrane glycoproteins with different degrees of structural complexity and cellular topology, CAR, CD46 and CFTR. CAR (cox-sackie-adenovirus receptor) and CD46 (complement regulatory protein and pathogen receptor) are well-characterized type I membrane receptors of the Ig-like family of molecules, which carry a single transmembrane domain (monospanins). Both CAR and CD46 can act as cell receptors for different viruses. CAR has been identified as the cell receptor for the human adenovirus serotype 5 (HAdV5), and other members of species A, C, D, E and F [43–46]. CD46 acts as a cellular receptor for several viral pathogens, including measles virus [47] and members of human adenovirus species B1, B2 (among them HAdV35) and D [43,48,49], and also plays the role of cofactor in the inactivation of complement components C3b and C4b by serum factor I [50]. CD46 and CAR differ in their cellular localization: CD46 is localized at the apical membrane of epithelial cells [48,50,51], whereas CAR is localized at the tight junctions [52]. The CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) is a complex type III membrane glycoprotein, with large intracytoplasmic N- and C-terminal domains and twelve membrane-spanning domains constituting a transmembrane, cAMP-dependent chloride channel [53–57]. It is mainly present at the cellular apical surface of epithelial cells [58,59], and localised in microdomains of the plasma membrane referred to as lipid rafts [60].

CHO cells have been shown to efficiently release MPs, even in the absence of stressing factors [17]. CHO cells were used to establish stable cell lines which constitutively express CAR, CD46 and CFTR (MP-donor cells). MPs derived from these cells were first tested for their capacity to incorporate CAR, CD46 or CFTR (MP packaging or pseudotyping), and secondly, for their competency in transferring the CAR, CD46, and CFTR proteins and their specific functions to naive CHO cells used as target cells (MP-recipient cells). We found that new biological functions associated to CAR, CD46 or CFTR were acquired by the target CHO cells after incubation with MP-CAR, MP-CD46 or MP-CFTR, respectively. Our results demonstrated that MPs have the therapeutic potential for the cell-to-cell transfer of bioactive molecules. The function(s) carried over by MPs could be direct, via MP-packaged therapeutic proteins, or indirect, via specific mRNAs, such as the mRNA encoding the wild-type CFTR for the correction of the defective chloride channel function in cystic fibrosis.

Results

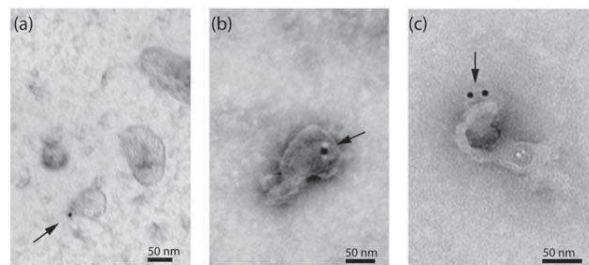
Isolation and Recovery of MPs from CAR- and CD46-expressing CHO Cells

The CHO-CAR and CHO-CD46 cells were derived from the parental CHO-K1 cell line to constitutively express and display CAR [44] and CD46 [61–63] at their surface, respectively. The recovery of MPs from stressed cells is usually higher than from nonstressed cells. However, since MPs issued from stressed cells could transfer stress signals and induce the apoptosis of recipient cells, our starting material was the culture medium of nonstressed CHO-CAR and CHO-CD46 cells. Extracellular MPs were recovered by a two-step ultracentrifugation procedure which separated MPs according to their size, consisting of a first sedimentation at 30,000×g, followed by a second at 100,000×g. Two populations were thus obtained, abbreviated MP₃₀ and MP₁₀₀, respectively (Fig. S1). The MP₃₀ fraction contained large MPs characterized by their heterogeneity in shape and size,

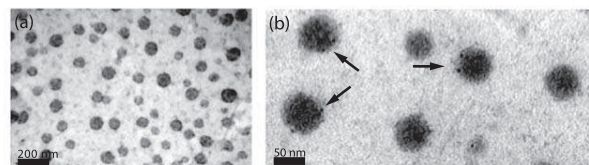
ranging from 50–500 nm in diameter, consistent with plasma membrane-shedded MPs (Fig. 1A). On the other hand, the MP₁₀₀ population consisted of homogenous and regular particles, rather spherical and relatively small in size (50–100 nm; Fig. 1B), reminiscent of exosomes or exosome-like particles [2,28]. Antibodies directed against human and mouse TSG101 and CD63, two surface markers of exosomes, were used in attempts to further characterize this population. However, no clear reaction was obtained with these antibodies on CHO cell lysates or MP pellets by Western blot or flow cytometry, respectively. Extracellular MPs released by CHO-CAR and CHO-CD46 cells were therefore differentiated only by their sedimentation properties, and referred to as MP₃₀ and MP₁₀₀ in the present study.

The yields of MPs spontaneously recovered from 10⁷ cells (CHO-CAR or CHO-CD46) ranged from 1×10⁷ to 3×10⁷ for MP₃₀ after 72 h culture, and a similar recovery was obtained for MP₁₀₀. After resuspension of the MP pellets in PBS, the total MP concentration (titer in physical MPs) of our working stocks usually ranged between 4×10⁷ to 7×10⁷ MPs/ml for MP₃₀ or MP₁₀₀, corresponding to total protein concentrations in the range of 700–850 ng/ml. Considering their size and composition heterogeneity, an average of 100 ng protein corresponded to a total number of 5×10⁶ to 7×10⁶ MP₃₀ or MP₁₀₀.

(A) MP₃₀CD46 + anti-CD46 Ab



(B) MP₁₀₀CD46 + anti-CD46 Ab



(C) MP₃₀CD46 + HAdV5F35

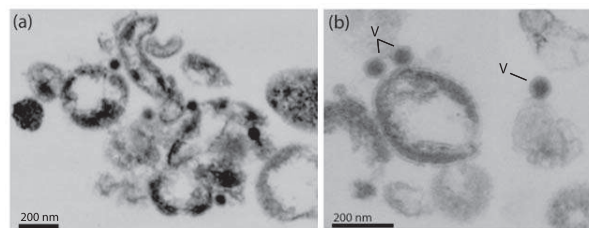


Figure 1. Electron microscopy (EM) of MPs isolated from CHO-CD46 cells. (A), Negative staining and immuno-EM of MP₃₀CD46. (B), Negative staining (a), and immuno-EM (b) of MP₁₀₀CD46. In (A) and (B), immunogold labeling was performed using anti-CD46 antibody and 10 nm-gold tagged complementary antibody. MP-associated gold grains are indicated by arrows. (C), Ultrathin sections of pelletable complexes of MP₃₀CD46-HAdV5F35, shown at low (a) and high (b) magnifications. Particles of HAdV5F35 vector (70–80 nm in diameter) in complex with MP₃₀CD46 are indicated by the letter V. doi:10.1371/journal.pone.0052326.g001

Efficiency of Incorporation of CAR and CD46 by MPs

MPs isolated from CHO-CAR and CHO-CD46 cells by our two-step ultracentrifugation procedure were referred to as MP₃₀CAR and MP₁₀₀CAR, and MP₃₀CD46 and MP₁₀₀CD46, respectively. The proportion of CAR-positive and CD46-positive MPs was determined by flow cytometry using specific antibodies, as this technique detected the CAR and CD46 molecules exposed at the MP surface, and potentially active as adenoviral receptors. The mean value of the percentage of MP₃₀CAR to total MPs was $5.8 \pm 1.4\%$ (mean \pm SEM, $n = 3$), corresponding to a mean bioactive MP titer of 2×10^5 MP₃₀CAR/ml, and only $2.8 \pm 1.2\%$ for MP₁₀₀CAR. On the other hand, the mean percentage of MP₃₀CD46 to total MPs was $7.5 \pm 1.5\%$ (viz. a mean bioactive MP titer of 5×10^5 MP₃₀CD46/ml), versus $2.2 \pm 1.3\%$ for MP₁₀₀CD46. Due to the higher proportion of MPs positive for CAR and CD46 glycoproteins in the MP₃₀ populations, MP₃₀CAR and MP₃₀CD46 were used for the MP-mediated protein transfer experiments. By taking into account the value of the bioactivity titer of our MP₃₀ stocks, the MP dose per target CHO cell ranged from 5 to 50 MP₃₀CAR or MP₃₀CD46.

The presence of CAR or CD46 molecules at the surface of MP₃₀ and MP₁₀₀ was confirmed by immunoelectron microscopy (immuno-EM), using anti-CAR or anti-CD46 mouse monoclonal antibody followed by a secondary 10 nm-gold-labeled anti-mouse IgG. The proportion of MP₃₀ or MP₁₀₀ associated with anti-CD46-bound or anti-CAR-bound colloidal gold grains was found to range between 2 to 3% (**Fig. 1A, B**). This value was consistent with the flow cytometry data, considering that MP₃₀ and MP₁₀₀ adsorbed on a solid support did not offer a full access to antibodies, compared to MPs in suspension.

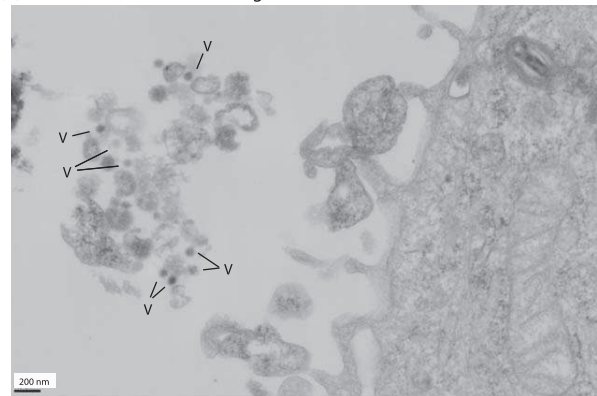
CD46 and CAR Molecules Displayed on MP₃₀ were Functional as Adenoviral Receptors

To assess the functionality of CAR and CD46 molecules on MP₃₀ as adenoviral receptors, samples of MP₃₀CAR and MP₃₀CD46 were incubated with HAdV5-GFP or HAdV5F35-GFP vectors for 2 h at 37°C, using equal numbers of MPs and vector particles. The samples were then layered over a 20%-sucrose cushion, and centrifuged at $30,000 \times g$ for 2 h. The material which pelleted through the cushion was fixed and embedded, and ultrathin sections were processed for observation under the electron microscope (EM). Numerous complexes of MP₃₀-viral vector particles were observed in the $30,000 \times g$ -pelletable fraction, as exemplified with MP₃₀CD46 and HAdV5F35-GFP (**Fig. 1C**). These results confirmed that CD46 and CAR molecules displayed on MP₃₀ were functional as cellular receptors for their specific adenoviruses. MP₃₀CHO from unmodified, parental CHO cells were used as negative control. MP₃₀CHO and MP₃₀CD46 were incubated with aliquots of HAdV5F35-GFP vector, as above, and the mixtures added to monolayers of target CHO cells. Samples were harvested after 2 h at 37°C, and processed for EM. Particles of adenoviral vector were observed in complex with MP₃₀CD46 at the surface of the target cells (**Fig. 2A**), whereas no vector particle in association with control MP₃₀CHO was observed (**Fig. 2B**).

MP-mediated Transfer of CAR and CD46 to Target Cells

(i) Transfer efficiency. To evaluate this parameter, aliquots of MP₃₀CAR and MP₃₀CD46 were added to CHO cell monolayers (10^5 cells per well; 5 MP₃₀/cell), and incubated for 2 h at 37°C. The supernatant was then removed and replaced by prewarmed complete medium. The cells were further incubated at 37°C, and cell samples were harvested at different time intervals,

(A) MP₃₀CD46 + HAdV5F35 / target cells



(B) Control MP₃₀CHO + HAdV5F35 / target cells

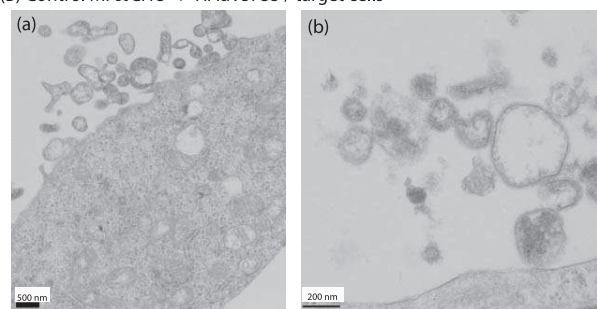


Figure 2. EM of target cells incubated with control MP₃₀CHO or MP₃₀CD46 in complex with HAdV5F35. (A), Ultrathin sections of target CHO cells incubated with MP₃₀CD46-HAdV5F35 complexes. V, particles of HAdV5F35 vector. (B), Ultrathin sections of target CHO cells incubated with control MP₃₀CHO from nontransduced CHO cells, mixed with HAdV5F35. Sections are shown at low (a) and high (b) magnifications. Note the absence of vector particles associated with control MP₃₀CHO.

doi:10.1371/journal.pone.0052326.g002

from 6 h to 10 days. The presence of CAR and CD46 molecules on the surface of recipient cells was determined by flow cytometry. The percentage of CAR- or CD46-positive cells was found to be approximately 3% at 6 h posttransfer (pt), 6–7% at 24–48 h, and 15–18% after 72 h. The plateau at about 15–18% was maintained until day-5, and progressively declined after one week (not shown).

(ii) Functionality of CAR and CD46 in MP-recipient cells (MP dose-dependence). To determine whether CAR and CD46 were functional as adenoviral receptors in MP-transduced cells, CHO cells were incubated with increasing doses of MP₃₀CAR or MP₃₀CD46, ranging from 0 to 30 MP₃₀/cell, and assayed at 48 h pt for their permissiveness to HAdV5-GFP and HAdV5F35-GFP, respectively. HAdV5-GFP and HAdV5F35-GFP were used at a constant MOI of 500 vp/cell. As negative control, MP₃₀CHO from parental CHO cells were used at the same doses. With MP₃₀CHO, or at low doses of MP₃₀CAR and MP₃₀CD46 (≤ 5 MP₃₀/cell), 2 to 10% cells were found to become GFP-positive (**Fig. 3**), which corresponded to the background of infection of CHO cells by HAdV5 and HAdV5F35 via other cell surface molecules, such as heparan sulfate glucosaminoglycans, which act as alternative receptors for HAdV5 and HAdV5F35 [43,64]. However, CHO cells pre-incubated with MP₃₀CAR or MP₃₀CD46, and infected with HAdV5-GFP and HAdV5F35-GFP, respectively, showed a 2- to 3-fold increase in GFP-positive cells. This significant increase in permissiveness to the adenovirus

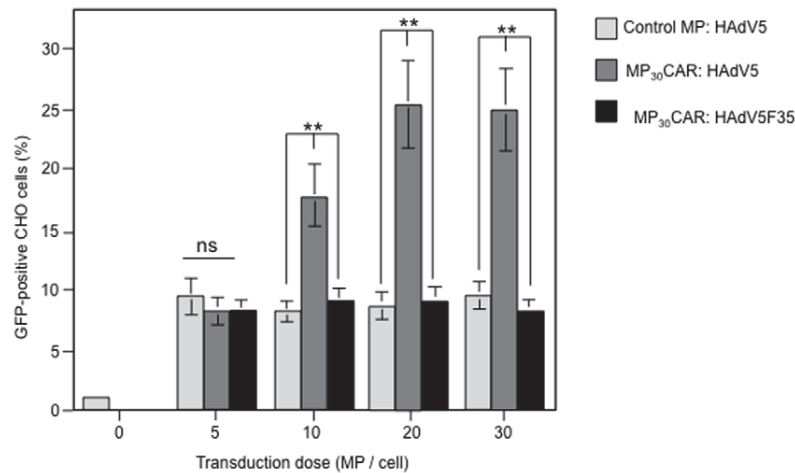
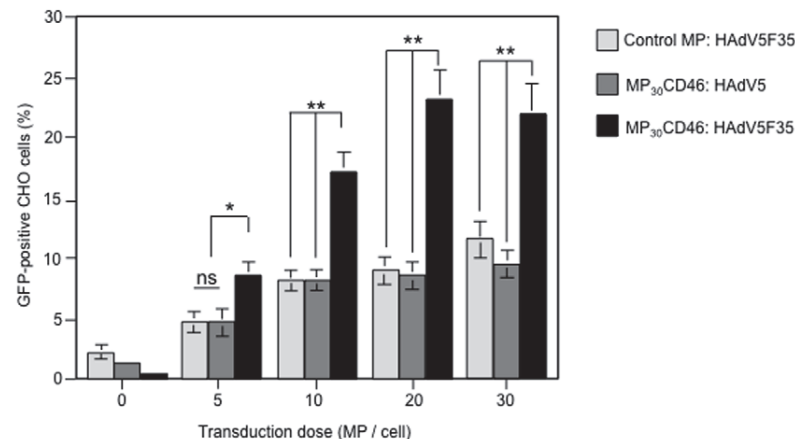
(a) MP₃₀ ± CAR : HAdV-GFP vectors(b) MP₃₀ ± CD46 : HAdV-GFP vectors

Figure 3. MP₃₀-mediated transfer and functionality of (a) CAR, or (b) CD46 as adenoviral receptors in target cells. Aliquots of CHO cells (target cells) were incubated with MP₃₀CAR (a) or MP₃₀CD46 (b) at different MP doses per cell, as indicated in the x-axis. At 72 h after MP₃₀-cell interaction, cells were infected with HAdV5-GFP or HAdV5F35-GFP vector, at the same MOI (500 vp/cell). The degree of CHO permissiveness to HAdV5-GFP or HAdV5F35-GFP vector was evaluated by flow cytometry analysis of the intracellular GFP signal. In (a), HAdV5F35-GFP, which does not recognize CAR as cellular receptor, was used as the negative control. In (b), HAdV5-GFP, which does not recognize CD46 as cellular receptor, was used as the negative control. MP₃₀ from nontransduced CHO cells (Control MP) served as the negative controls in both panels. doi:10.1371/journal.pone.0052326.g003

vectors was MP dose-dependent (Fig. 3). These results indicated that MP₃₀CAR and MP₃₀CD46 were capable of transferring the CAR and CD46 molecules to CHO target cells.

(iii) Receptor specificity in MP-recipient cells. As additional controls, we assessed the specificity of vector-receptor recognition, by infecting MP₃₀CD46-transduced cells with HAdV5-GFP, and *vice versa*, MP₃₀CAR-transduced cells with HAdV5F35-GFP. Only a background GFP signal was detected with these two heterotypic pairs, demonstrating the specificity of the newly acquired CAR and CD46 receptor molecules towards their respective adenoviral vectors (Fig. 3).

(iv) Functionality of CD46 as complement regulatory factor in MP-recipient cells. The antiapoptotic activity of CD46 transferred to CHO cells was analyzed in CHO cells interacted with MP₃₀CHO or with MP₃₀CD46, then incubated with increased doses of complement fraction C3. A significant effect of protection against complement lysis was observed in

MP₃₀CD46-transduced CHO cells, by comparison to control cells (Fig. 4A).

Influence of VSV-G Incorporation on MP₃₀-mediated Transfer of CAR or CD46

The following experiments were designed to determine whether the transfer of CAR or/and CD46 to target CHO cells would be improved by the incorporation of VSV-G, the envelope glycoprotein G of vesicular stomatitis virus, into the MP envelope. We found that baculovector-mediated expression of VSV-G in CHO-CAR and CHO-CD46 cells did not enhance the production of CAR- or CD46-pseudotyped MPs (data not shown). Likewise, coinfection of VSV-G with CAR or CD46 into MP₃₀ did not significantly increase the degree of permissiveness of CHO cells to HAdV5-GFP or HAdV5F35-GFP after transduction by MP₃₀CAR-VSV-G or MP₃₀CD46-VSV-G (Fig. S2). This implied

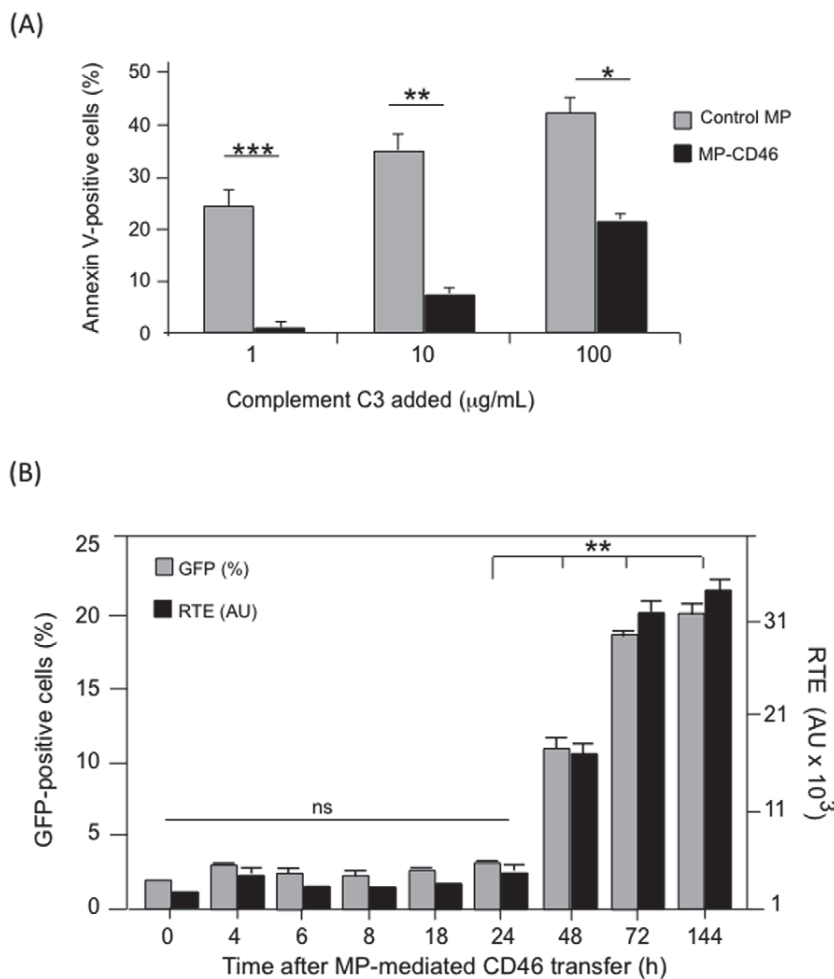


Figure 4. Functionality of exogenous CD46 in MP₃₀CD46-transduced CHO cells. (A), CD46 as complement C3 regulator. CHO cells were harvested at 48 h posttransfer, and the CD46-induced protection against complement C3-mediated cell apoptosis was assayed by the percentage of Annexin V-positive cells determined by flow cytometry at increasing doses of complement C3. **(B), Kinetics of the gain of adenoviral receptor function by MP₃₀CD46-transduced CHO cells.** CHO cells were harvested at different times after MP₃₀CD46-transfer, and cell permissiveness to the HAdV5F35-GFP vector was assessed by infection with HAdV5F35-GFP at MOI 500. Cells were analyzed for GFP signal at 48 h postinfection. The degree of permissiveness to the vector was expressed as the percentage of GFP-positive cells (left y-axis), and the relative transduction efficiency (RTE; right y-axis). The RTE, in arbitrary units (AU), was given using the formula = (percentage of GFP-positive cells) x (MFI; mean fluorescence intensity).

doi:10.1371/journal.pone.0052326.g004

that VSV-G was not a facilitator of MP₃₀ uptake by the target CHO cells, and VSV-G was not included in the following experiments.

Time-course Analysis of the Acquisition of New Functionality by MP₃₀-recipient Cells

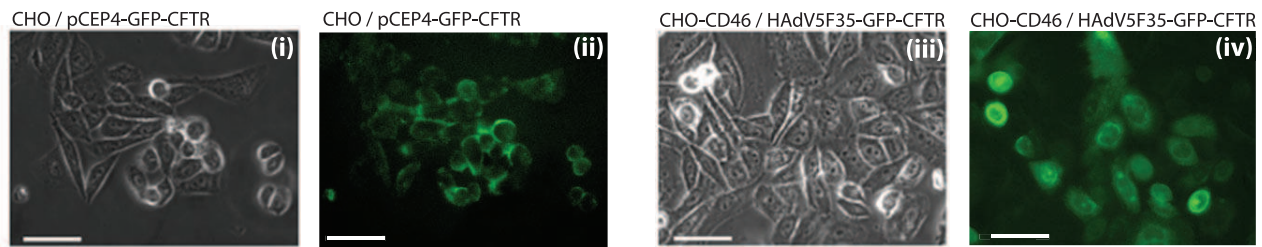
The next issue was to determine at which time after MP₃₀CD46-cell interaction the CHO target cells acquired the adenovirus receptor function carried by CD46. CHO cells were incubated with a constant dose of MP₃₀CD46 (20 MP₃₀/cell), and at different times after MP₃₀-cell interaction, the cells were incubated with HAdV5F35-GFP vector at constant vector MOI (500 vp/cell) for 2 h at 37°C. At 48 h post-infection (pi), the permissiveness of the cells to HAdV5F35-GFP was determined by flow cytometry analysis. A progressive increase in adenoviral permissiveness was observed, with 10% GFP-positive cells at 48 h pi, reaching a plateau of 20–25% GFP-positive cells at 72–144 h (Fig. 4B). Similar results were obtained with MP₃₀CAR (not

shown). The kinetic data implied that a larger proportion of cells became permissive to adenovirus with time, and suggested the contribution of additional CD46 molecules. This was likely due to newly synthesized CD46 from CD46-encoding mRNA transferred by MP₃₀CD46 to the target cells, as demonstrated below for MP-mediated CFTR transfer.

Generation of CHO Cells Stably Expressing GFP-CFTR

A CHO cell line stably expressing GFP-fused human CFTR was generated (CHO-GFP-CFTR) using the pCEP₄-GFP-CFTR episomal plasmid. The pCEP₄-GFP-CFTR-directed expression of the GFP-CFTR fusion protein in these cells showed localisation of GFP signal in the cytoplasm, perinuclear and submembrane regions (Fig. 5A i, ii; and Fig. S3A). A similar fluorescence pattern was observed in CHO-CD46 cells transduced by the HAdV5F35-GFP-CFTR vector which were used as positive control (Fig. 5A iii, iv). In CHO-GFP-CFTR cells, the CFTR molecules were correctly oriented in the plasma membrane, as

(A) Phase contrast & epifluorescence microscopy



(B) Anti-CFTR reactivity (FACS)

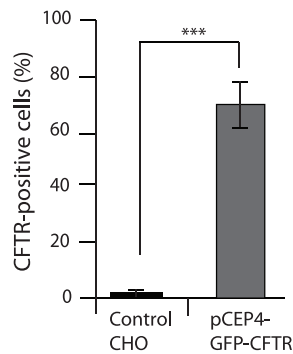
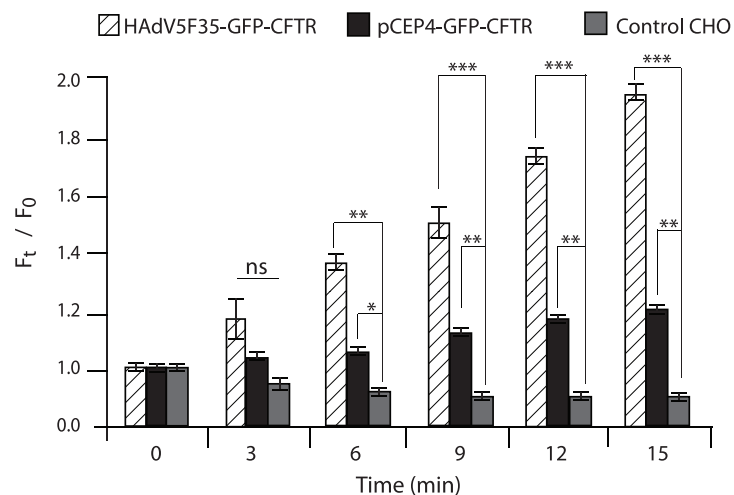
(C) CFTR channel activity (DISBAC₂(3) assay)

Figure 5. Expression, immunoreactivity and functionality of GFP-CFTR protein expressed from an episomal plasmid in CHO cells (MP-producer cells). (A), CHO cells harboring the GFP-CFTR-encoding pCEP4 episomal plasmid, were examined by phase-contrast (i) and epifluorescence microscopy (ii) of GFP-tagged CFTR protein. Positive controls, consisting of CHO cells transduced by the adenoviral vector HAdV5-GFP-CFTR were similarly examined by phase-contrast (iii) and epifluorescence microscopy (iv). Scale bars, 20 μ m. (B), Surface expression and correct orientation of the GFP-tagged CFTR protein in pCEP4-GFP-CFTR harboring CHO cells, evaluated by flow cytometry using monoclonal antibody against the first extracellular loop of the CFTR ectodomain. (C), Chloride channel activity of CFTR in negative control CHO cells (dotted bars), positive control HAdV5F35-GFP-CFTR-transduced CHO-CD46 cells (hatched bars), and pCEP4-GFP-CFTR harboring CHO cells (black bars), evaluated using the fluorescent probe DiSBAC₂(3). The time-course analysis of DiSBAC₂(3) fluorescence changes in the presence of a cocktail of CFTR activators was monitored in regions of the cell monolayers corresponding to 20–30 cells. Bars represent the mean fluorescence value for each field of 20–30 cells \pm SEM. Symbols: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ns, not significant. doi:10.1371/journal.pone.0052326.g005

shown by the labeling of nonpermeabilized CHO-GFP-CFTR cells with an anti-CFTR monoclonal antibody directed against the first extracellular loop of the CFTR ectodomain (Fig. 5B).

The chloride channel function in CHO-GFP-CFTR cells was investigated using the voltage-sensitive probe DiSBAC₂(3). The fluorescent signal of DiSBAC₂(3) has been shown to vary with changes of the membrane potential induced by the cAMP/low-chloride-mediated activation of the CFTR [65]. Parental CHO cells were used as negative controls, and CHO-CD46 cells transduced by the HAdV5F35-GFP-CFTR vector were used as positive controls. A positive fluorescent signal was observed in CHO-GFP-CFTR cells in response to the addition of the cAMP-based cocktail of CFTR activators, demonstrating the functionality of the exogenous GFP-CFTR molecules as chloride channels (Fig. 5C). HAdV5F35-GFP-CFTR-transduced cells used as positive control showed a strong enhancement of the fluorescent signal in the presence of CFTR activators (Fig. 5C), consistent with the high transduction efficiency of CHO-CD46 by HAdV5F35 [55,66]. CHO-GFP-CFTR cells were then tested

for the production of MPs carrying GFP-CFTR (MP-GFP-CFTR) and the MP-mediated delivery of CFTR to target cells.

Isolation and Recovery of MP-GFP-CFTR

MP₃₀GFP-CFTR and MP₁₀₀GFP-CFTR were recovered from the CHO-GFP-CFTR cell culture medium by the ultracentrifugation procedure mentioned above and depicted in Fig. S1. The presence of the GFP-tag allowed the direct tracking of GFP-CFTR molecules in the different cell compartments, such as the vesicular compartment and plasma membrane [55,66]. It also allowed the detection of GFP-CFTR incorporated in MPs derived from GFP-CFTR-expressing cells. The recovery of MP₃₀GFP-CFTR and MP₁₀₀GFP-CFTR ranged from 1×10^7 to 5×10^7 per 10^7 CHO-GFP-CFTR cells. Flow cytometry analysis indicated that the GFP-CFTR signal was detected in both MP₃₀ and MP₁₀₀ populations, although in significantly higher amounts in MP₃₀ compared to MP₁₀₀: $10.3 \pm 3.3\%$ GFP-CFTR-positive MP₃₀ ($m \pm$ SEM, $n = 3$), versus $3.6 \pm 3.3\%$ for MP₁₀₀. The presence of CFTR in both MP populations was not surprising, considering the trafficking of

CFTR molecules between intracellular membranous compartments and the cell surface.

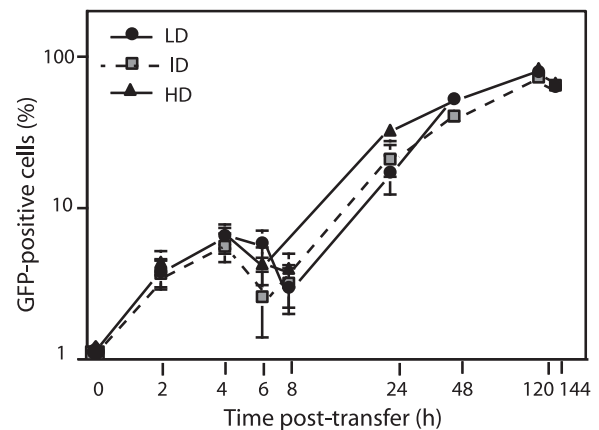
Fractionation of MP₃₀GFP-CFTR and MP₁₀₀GFP-CFTR Populations and Distribution of GFP-CFTR between MP Subclasses

To obtain the maximum efficiency of GFP-CFTR transfer to target cells, it was important to determine whether a particular MP fraction could be enriched in GFP-CFTR. To this aim, the MP₃₀ and MP₁₀₀ populations from CHO-GFP-CFTR cells were further fractionated into subpopulations differing in density, using ultracentrifugation in isopycnic gradients [67]. Three subpopulations, corresponding to three density classes, were obtained for each MP population (**Fig. S1**): (i) MPs of low density (MP₃₀LD and MP₁₀₀LD) with a mean density (ρ_m) of 1.10; (ii) MPs of intermediate density (MP₃₀ID and MP₁₀₀ID; $\rho_m = 1.16$); and (iii) MPs of high density (MP₃₀HD and MP₁₀₀HD; $\rho_m = 1.21$). Each subclass of MP₃₀ and MP₁₀₀ populations was then assayed for the presence of GFP-CFTR by flow cytometry analysis. The GFP-CFTR protein was detected in all MP subclasses, with the highest proportion of GFP-CFTR-positive MPs found in the high-density compared to low-density subclasses: 14.5% for MP₃₀HD versus 6.2% for MP₃₀LD, and 8.3% for MP₁₀₀HD versus 1.4% for MP₁₀₀LD (**Table 1**). This data suggested that CFTR glycoprotein was associated with the higher density MPs.

Kinetics of MP-mediated Transfer of GFP-CFTR to Target Cells

The following experiments were designed to determine the capacity of each subpopulation of MPs to transfer GFP-CFTR to target CHO cells. The MP₃₀ (LD, ID and HD), and MP₁₀₀ (LD, ID and HD) subclasses were incubated with CHO cells at a ratio of 5 MPs/cell for 2 h at 37°C. Inocula were removed, and monolayers were postincubated with fresh, prewarmed medium at 37°C for 6 days. At different time-points, cell samples were examined by fluorescence microscopy and flow cytometry for qualitative and quantitative analyses of the GFP signal, respectively. With the MP₃₀ population, the GFP profiles did not differ significantly for the three subclasses. At 2 h pt, 3.8 to 4.4% CHO cells were GFP-positive, increasing to 5.5–6.6% at 4 h pt, followed by a slight decrease at 6–8 h pt (**Fig. 6A**). At 8 h pt, the proportion of GFP-positive cells increased progressively for the three MP₃₀ subclasses, to attain a value of 73–83% GFP-positive cells 5 days pt (**Fig. 6A**). A similar kinetics of appearance of GFP-positivity was observed with the three MP₁₀₀ subclasses: a discrete peak was detected at 4 h pt, followed by a slight decrease at 6–8 h pt, and a progressive increase to 57–76% GFP-positive cells after 5 days (**Fig. 6B**).

(A) MP₃₀



(B) MP₁₀₀

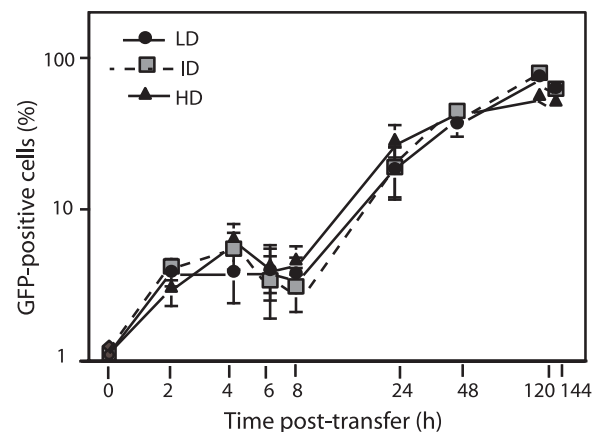


Figure 6. Time-course expression of GFP-CFTR in MP-transduced CHO cells. (A), (B), GFP-positive cells (expressed as %) were determined by flow cytometry analysis of MP₃₀-transduced (A) and MP₁₀₀-transduced cells (B), harvested at different times post-transfer (pt). Bars represent mean values \pm SEM ($n = 3$). doi:10.1371/journal.pone.0052326.g006

The cell surface expression and proper membrane insertion of GFP-CFTR was investigated by flow cytometry, using the anti-CFTR ectodomain antibody as above. The maximal CFTR display at the cell surface was observed at 2–3 days pt, with 50–60% CFTR-positive cells after MP₃₀-mediated transduction (**Fig. 7A**). Similar levels (60–70% CFTR-positive cells) were

Table 1. Proportion of GFP-positive MPs in the different MP subclasses, and GFP-CFTR mRNA content ^(a).

Density subclass	GFP(+) MP ₃₀ (% total MP)	GFP(+) MP ₁₀₀ (% total MP)	GFP-CFTR RNA in MP ₃₀ ^(b)	GFP-CFTR RNA in MP ₁₀₀ ^(b)
LD ($\rho_m = 1.10$)	6.2 \pm 2.5	1.4 \pm 0.4	82.5 \pm 14.3	97.7 \pm 77.0
ID ($\rho_m = 1.16$)	10.4 \pm 1.7	1.2 \pm 1.2	61.6 \pm 35.2	44.0 \pm 32.3
HD ($\rho_m = 1.21$)	14.5 \pm 3.2	8.3 \pm 2.1	51.3 \pm 30.7	60.5 \pm 22.5

^(a)The proportion of GFP-positive MPs was determined by flow cytometry, and the GFP-CFTR mRNA content by qRT-PCR analysis. Data shown in the Table are mean values (m) \pm SEM ($n = 3$).

^(b)The values obtained after RT-PCR amplification of a RNA fragment of 196 nt in length overlapping the GFP C-terminal and CFTR N-terminal sequences were expressed as ng RNA per 10⁷ MP₃₀ or MP₁₀₀. doi:10.1371/journal.pone.0052326.t001

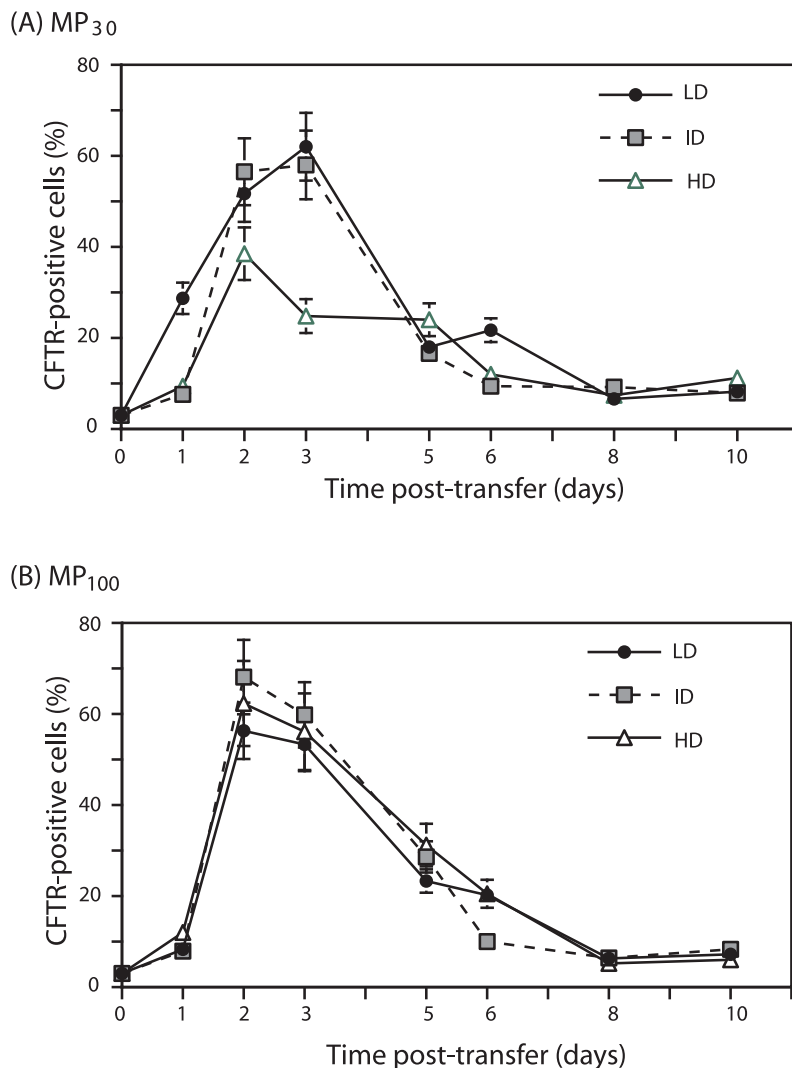


Figure 7. Time-course expression of GFP-CFTR glycoprotein at the surface of MP-transduced CHO cells. Cells harvested at different times after MP-cell transfer were analyzed by flow cytometry for the immunoreactivity of the first N-terminal loop of the CFTR ectodomain with anti-CFTR monoclonal antibody. **(A)**, MP₃₀-transduced CHO cells. **(B)**, MP₁₀₀-transduced CHO cells. Bars represent mean values \pm SEM ($n=3$). doi:10.1371/journal.pone.0052326.g007

observed after MP₁₀₀-mediated transduction (**Fig. 7B**). The presence of CFTR at the cell surface progressively declined after day-4 (**Fig. 7A, B**).

Interestingly, there was a slight, but significant difference in profile between the GFP signal and the CFTR ectodomain immunoreactivity. The proportion of GFP-positive cells remained as a plateau after 6 days (refer to Fig. 6 A, B) whereas the display of CFTR at the cell surface decreased after day-4 (refer to Fig. 7). Likewise, MP₃₀- and MP₁₀₀-recipient cells examined at day-5 pt by confocal microscopy showed that the majority of the GFP-CFTR signal appeared as cytoplasmic dots and speckles corresponding to vesicular compartment(s), and in relatively low proportion at the plasma membrane (**Fig. S3B**).

Occurrence of GFP-CFTR-encoding mRNA in MPs and MP-recipient Cells

The kinetics of appearance of GFP-positive cells shown in Fig. 5 suggested an early (4 h pt) and a late phase (3 days pt) of MP-mediated GFP-CFTR transfer. We hypothesized that at early

times after interaction of MP₃₀ and MP₁₀₀ with target cells, membrane-inserted GFP-CFTR glycoprotein molecules were transferred to a small number of target cells (less than 10%), following a pathway of MP-cell binding, endocytosis and membrane fusion. At late times, the GFP-CFTR protein detected in the MP-recipient cells was likely due to the neosynthesis of GFP-CFTR from MP-embarked GFP-CFTR-encoding mRNA molecules. To test this hypothesis, total RNA were extracted from the different MP₃₀ and MP₁₀₀ subclasses, and analysed for the presence of GFP-CFTR-encoding mRNA (mRNA^{GFP-CFTR}), using quantitative RT-PCR and specific primers overlapping the junction of the GFP C-terminal and CFTR N-terminal coding sequences [55,66]. All MP subclasses were found to contain comparable amounts of mRNA^{GFP-CFTR} (**Table 1**). However, when the values of the MP content of mRNA^{GFP-CFTR} were expressed as the ratio to β -actin mRNA content used as endogenous control, significant differences in composition were observed between the MP subclasses (**Fig. 8A, B**).

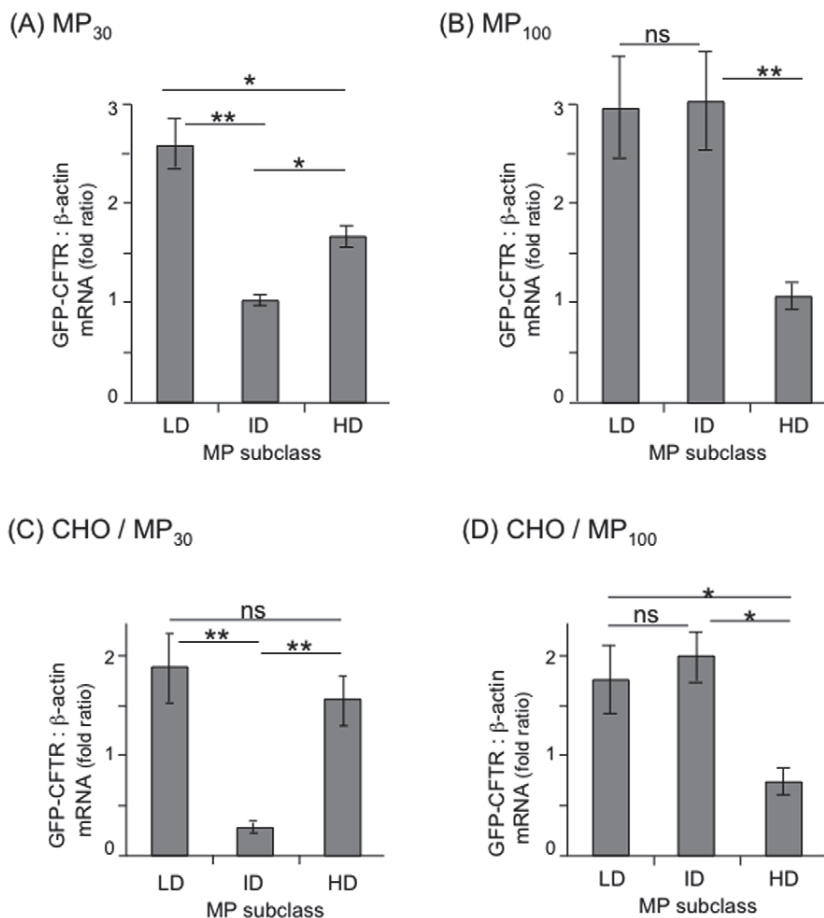


Figure 8. Occurrence of GFP-CFTR-encoding mRNA in MPs and MP-transduced CHO cells. Bar graph representation of qRT-PCR assays of MP₃₀ (A), MP₁₀₀ (B), MP₃₀-transduced CHO cells (C), and MP₁₀₀-transduced CHO cells (D). Data shown in the graphs are mean values (m) \pm SEM ($n=3$). Symbols: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ns, not significant. doi:10.1371/journal.pone.0052326.g008

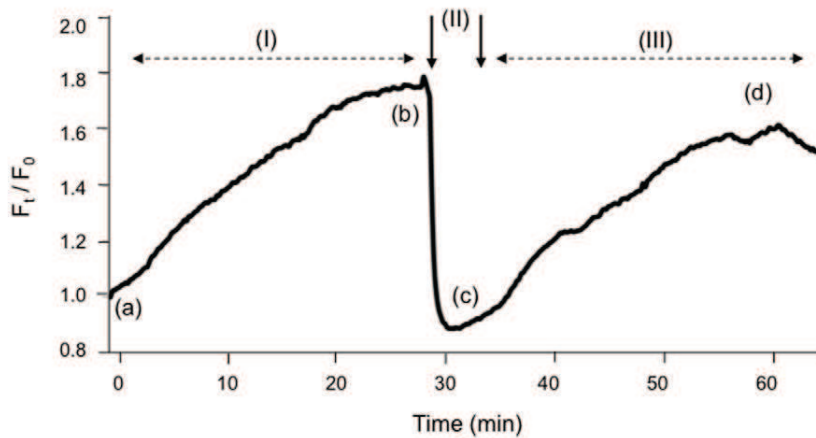
Similarly, total RNA were extracted from MP-recipient cells incubated with MP₃₀ (LD, ID and HD), and MP₁₀₀ (LD, ID and HD) at day-5 pt, and qRT-PCR was carried out as above, using β -actin mRNA as internal control. As positive controls, CHO-CD46 cells transduced by HAdV5F35-GFP-CFTR were processed for RNA extraction and qRT-PCR assays. We found that the recipient cells incubated with all the different subclasses of MP₃₀ and MP₁₀₀ contained mRNA^{GFP-CFTR}, with a ratio to β -actin content varying from 0.5- to 2-fold (Fig. 8C, D). Interestingly, the variations in the cellular content of mRNA^{GFP-CFTR} reflected the respective contents of the different MP subclasses. The observation that almost 80% of the cells expressed GFP-CFTR protein at late times pt suggested that nearly all cells received mRNA^{GFP-CFTR} molecules when a bioactive MP-to-cell ratio of 5 MPs/cell was used.

The efficiency of transfer of mRNA^{GFP-CFTR} was calculated as follows. The average content of donor cells was found to be 4.4×10^8 copies of mRNA^{GFP-CFTR} per μ g total cellular RNA extracted, with values ranging from 2.2×10^8 to 6.6×10^8 copies. The average content of MP-recipient cells incubated with MP₁₀₀-GFP-CFTR was 3.5×10^7 copies of mRNA^{GFP-CFTR} at 48 h after transfer using 5 MPs/cell, with values ranging from 1.7×10^7 to 5.3×10^7 copies per μ g total cellular RNA. We estimated the transfer efficiency as the ratio $3.5 \times 10^7 : 4.4 \times 10^8 \approx 8\%$.

To eliminate the possibility of DNA transfer via MPs, CHO cells were harvested at 48 h after incubation with each of the different subclasses of MP₃₀ and MP₁₀₀, the DNA extracted and probed for the episomal plasmid pCEP4-GFP-CFTR, using PCR amplification of a 196 nt fragment overlapping the *GFP*-3' and *CFTR*-5' sequences [66]. No specific DNA fragment was found at this position in all cell samples tested (Fig. S4).

Functionality of Exogenous CFTR as Chloride Channel in MP-recipient Cells

The next issue to address was whether target CHO cells incubated with MP-GFP-CFTR acquired the CFTR-associated chloride channel activity. CHO cells were taken 3 days after incubation of MP₃₀-GFP-CFTR or MP₁₀₀-GFP-CFTR, the time at which a maximum number of cells were observed to be GFP- and CFTR-positive (refer to Fig. 6 and 7). The changes of the DiSBAC₂(3) fluorescent signal in MP-transduced cells in response to the CFTR activator and inhibitor were monitored by quantitative fluorescence microscopy (Fig. 9). As exemplified with MP₁₀₀-GFP-CFTR, the fluorescent signal increased progressively in the presence of CFTR activators, and rapidly decreased to background levels upon the addition of the CFTR inhibitor GlyH-101 (Fig. 9). This effect was reversible, as the fluorescence recovered progressively with the removal of GlyH-101 from the

(A) DiSBAC₂(3) assay

(B) Cell imaging

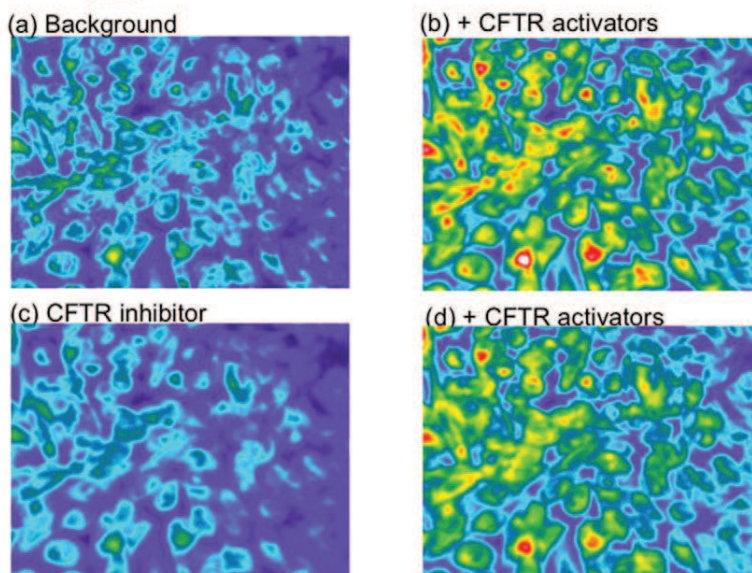


Figure 9. CFTR channel activity in MP-transduced CHO recipient cells. (A), Evolution of the DiSBAC₂(3) fluorescence signal. The time-course analysis of DiSBAC₂(3) fluorescence changes was monitored in regions of the cell monolayer corresponding to 20–30 cells, taken at 72 h post-transfer, a time point corresponding to the maximal immunoreactivity of CFTR glycoprotein at the cell surface. Changes in the fluorescent signal were expressed as F_t/F_0 ratio values, in which F_t and F_0 were the fluorescence values at the times t and t_0 , respectively, and t_0 the time when the cAMP-containing, CFTR-activating cocktail was added. The cocktail of CFTR activators was maintained throughout the experiment. The CFTR inhibitor GlyH-101 was added for 5 min (phase II, marked by two vertical arrows). Phase III shows reversibility of the CFTR block and recovery of the fluorescent signal. **(B), Fluorescence microscopy.** Photographs of cell monolayers were taken at different time-points corresponding to the four successive phases, as indicated on the curve by the letters (a), (b), (c) and (d).
doi:10.1371/journal.pone.0052326.g009

cAMP-containing superfusion medium (**Fig. 9**). Thus, the target CHO cells showed a gain in biological function, i.e. the chloride channel activity associated with acquired CFTR molecules.

Discussion

The current trends in biotherapy comprise the development of stem cell technology in combination with *ex vivo* gene therapy, the improvement of synthetic vectors, or the design of immunologically stealthy viral vectors, or safer viral integrative vectors with controlled integration sites in host cells. The present study

explored an alternative strategy to transfer therapeutic biomolecules to target cells, using MPs as conveyors. MPs have been reported to successfully mediate the transfer of surface molecules, such as receptors and extracellular matrix proteases, and also intracellular components, including proteins, lipids and RNA molecules of different types [1–3,27].

In the present study, the cellular model for MP production and uptake was the Chinese Hamster Ovarian (CHO) cell line, used as MP-producer and MP-recipient cells. This choice was based on the following considerations. (i) CHO cells did not express orthologs of the human CAR, CD46 and CFTR glycoproteins,

which made possible the assessment of the capability of MPs to transfer the CAR-, CD46- and CFTR-specified function(s) to these target cells. (ii) Previous experiments of expression of human CFTR, CAR and CD46 in CHO cells have shown the functionality of these proteins and their localisation at the plasma membrane [44,48,63,68]. (iii) A homologous cell system, with the maximal degree of compatibility between MP-donor and MP-recipient cells in terms of membrane composition, would optimize the cell-to-cell transfer of biological material.

Three types of human cell surface molecules with different degrees of complexity were used as prototype bioactive glycoproteins in our study: (i) CAR and (ii) CD46, which are both monospanins and act as high affinity receptors for human adenovirus serotypes 5 and 35, respectively; and (iii) CFTR, a complex transmembrane glycoprotein which functions as a chloride channel. The MP-donor cells were CHO cell lines which constitutively expressed CAR, CD46, or CFTR. MP-target cells were naive CHO cells, which lacked CAR and CD46 and did not express the equivalent of the human CFTR glycoprotein. In all the three cases, the MP-donor cells were grown in the absence of chemical or biological stress, to avoid the occurrence of apoptotic factors within MPs and the possible transfer of stress signals to recipient cells. The populations of MPs issued from CAR-, CD46- or CFTR-expressing CHO cells were separated according to their size by velocity ultracentrifugation, yielding MP₃₀ and MP₁₀₀ fractions.

We found that it was possible to transfer CAR and CD46 to target CHO cells using MPs as vehicles, resulting in the acquisition of new biological functions by the target cells. CHO cells incubated with MP₃₀CAR and MP₃₀CD46 became permissive to HAdV5 and AdV5F35 infection, respectively. In addition, cells incubated with MP₃₀CD46 acquired resistance to complement C3-induced apoptosis. The MP-mediated transfer of CD46 might have potential therapeutic applications in the control of allograft rejection, as well as in gene therapy and/or vaccinology using HAdV35-based vectors. The MP-mediated transfer of CAR might be used to confer viral permissiveness to adenovirus-refractory cells, such as tumor cells towards HAdV5-based oncolytic vectors. The viral glycoprotein VSV-G, which has a high fusogenic activity, has been advantageously used to augment the efficacy of membrane fusion between virus (or VLP) and target cells [35,37–39,69–71]. In the present study however, coinorporation of VSV-G at the surface of MP₃₀CAR or MP₃₀CD46 did not improve the transfer efficiency of CAR or CD46 molecules to target cells.

In the case of CFTR, MPs were isolated from the culture medium of CHO cells which were engineered to constitutively express GFP-CFTR. MP₃₀GFP-CFTR and MP₁₀₀GFP-CFTR obtained by velocity ultracentrifugation were further fractionated into three density subclasses: MPs of low, intermediate and high density, respectively. All MP subclasses incorporated significant levels of GFP-CFTR protein as well as mRNA^{gfp-cftr}, with no significant variations between the different subclasses. Likewise, all MP subclasses were competent in transferring GFP-CFTR to target CHO cells. The kinetics of appearance of the GFP signal in these cells showed two separate peaks, which suggested an early (4–6 h) and late phase (3 days) of protein transfer after MP-cell interaction. The early GFP signal detected in target cells likely resulted from the transfer of GFP-CFTR protein via different mechanisms described in the literature [1–4], such as the direct fusion between MP membrane and target cell plasma membrane, endocytosis of the MPs and recycling of GFP-CFTR to the cell surface, or the coexistence of both mechanisms. Interestingly, the incorrect insertion and orientation of a protein in the plasma membrane of recipient cells have been reported [72]. In the

present study, the GFP-CFTR was inserted in the plasma membrane of target cells in the correct in-out orientation, as validated by an antibody recognising an extracellular loop of the CFTR.

At the late phase after MP transfer, almost 80% of the target cells became positive for GFP-CFTR, due to GFP-CFTR molecules issued from *de novo* protein synthesis directed by exogenous mRNA^{gfp-cftr} (free or/and polysomal) transferred over by MP₃₀ or MP₁₀₀. Attempts to block the protein synthesis machinery in MP-recipient CHO cells using cycloheximide (CH) were performed to further explore this mechanism. However, the results were inconclusive, due to the unexpected high cytotoxicity of CH towards GFP-CFTR-expressing CHO cells, when treated with the protein synthesis inhibitory doses usually applied to human cells (10 to 20 µg/mL; [73]). Of note, the half-life of the CFTR gene products in human cells has been determined to be ~48 h for the CFTR glycoprotein [74,75], and ≥20 h for the mRNA^{cftr} [76].

MPs have been shown to carry and transfer mRNAs and microRNAs to target cells, as a general mechanism of intercellular communication [3,5,7,11,27,29]. MP-delivered RNA has been termed shuttle RNA ([11]), and has been found to be functional in the new cellular context [7,29,77–80]. Consistent with the results of these previous studies, our experimental data showed that our shuttling mRNA^{gfp-cftr} was functional, and that neosynthesized GFP-CFTR glycoproteins were addressed to the cell surface of target cells, correctly inserted into their plasma membrane, and metabolically active in anion transport. Using a fluorescent voltage sensitive DISBAC₃(2) probe assay, the CFTR-associated chloride channel activity was detected in MP-recipient cells at the late phase (day-3), when the translational machinery from the exogenous mRNA^{gfp-cftr} became fully operational. The chloride channel function was not detectable in MP-recipient cells at early times, possibly due to a threshold in the detection of this activity using the fluorescent probe.

Our observation that MP₃₀ and MP₁₀₀ produced by CHO-GFP-CFTR donor cells were equally capable of transferring mRNA^{gfp-cftr} to target cells implied that both populations were competent for CFTR delivery. Fractionation of MP₃₀ or MP₁₀₀ by isopycnic ultracentrifugation did not result in any significant enrichment of a particular subclass in mRNA^{gfp-cftr} molecules. However, in future studies using MPs issued from donor cells of human origin, fractionation of MPs specifically carrying mRNA^{cftr} using MP sorting based on surface markers available in human cells, would be advantageous for a higher efficiency of CFTR delivery. Cell-derived MP₃₀ or MP₁₀₀ appeared therefore as promising biological vehicles of therapeutic mRNAs exerting their therapeutic function(s) indirectly, via their encoded proteins. In particular, in the case of cystic fibrosis, MPs have a potential application in nongenic, cell-to-cell autologous transfer of human mRNA^{cftr} and the restoration of the normal chloride channel function in CFTR-deficient cells.

Materials and Methods

Cells and Plasmids

HEK-293 cells, obtained from the ATCC (Manassas, VA), were maintained as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-Invitrogen), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) at 37°C and 5% CO₂. Chinese hamster ovarian cells (CHO-K1 or simply CHO) was obtained from the ATCC, CAR-expressing CHO cells (CHO-CAR) from Dr. J. Bergelson [44], and CD46-expressing CHO cells (CHO-CD46)

from Dr. D. Gerlier [63]. They were grown in Iscove's medium supplemented with 10% FBS and 50 µg/ml gentamicin (Invitrogen). To generate the CHO cell line stably expressing GFP-CFTR, the GFP-CFTR gene was excised from the plasmid pGFP-CFTRwt described in a previous study [55], using *Nhe* I and *Sma* I digestion, and inserted into pCEP₄ (Invitrogen, Life Technologies). This plasmid vector was designed for high-level, constitutive expression from the CMV promoter, and which contains the EBNA-1 gene for episomal maintenance in human cell lines. *Sfi* I-linearized and blunted pCEP₄ was further digested with *Nhe* I. After purification by agarose gel electrophoresis, the *Nhe* I-cut pCEP₄ was ligated with the GFP-CFTR-containing *Nhe* I-*Sma* I DNA fragment, generating the pCEP₄-GFP-CFTR vector. CHO cell monolayers were transfected with pCEP₄-GFP-CFTR, using Lipofectamine-2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. CHO cells harboring pCEP₄-GFP-CFTR (referred to as CHO-GFP-CFTR) were selected using culture medium alpha-MEM with ribonucleosides (Invitrogen), supplemented with 5% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and hygromycin-B (50 µg/mL). The episomal plasmid pCEP₄-GFP-CFTR was found to be maintained in transfected cells for at least six months under hygromycin-B selection pressure.

Isolation of MPs Carrying Human Glycoproteins CAR (MP-CAR), CD46 (MP-CD46) or GFP-CFTR (MP-GFP-CFTR) (Fig. S1)

(i) Velocity ultracentrifugation. MPs were recovered from the culture medium of nonstressed cells, consisting of control CHO (MP-CHO), CHO-CAR (MP-CAR), CHO-CD46 (MP-CD46) and CHO-GFP-CFTR (MP-GFP-CFTR). This was carried out by using a previously published centrifugation protocol [81] with the following modifications. Cells were seeded at 70–80% confluence, grown for 48 h to reach confluence (10^7 cells), then maintained for an additional 24 h. Culture medium was clarified from cell debris by centrifugation for 2 min at $13,000\times g$ and 4°C . This clarified supernatant (S0) was the source of MPs. S0 was centrifuged at $30,000\times g$ and 4°C for 2 h. The pellet P1 was kept, and referred to as MP₃₀. The supernatant (S1) was centrifuged at $100,000\times g$ and 4°C for 2 h, to obtain pellet P2, referred to as MP₁₀₀. Pellets P1 and P2 were resuspended in 200 µl phosphate buffered saline (PBS) with gentle mixing, for further analysis by flow cytometry, and stored at 4°C before use for MP-mediated protein transfer, or further MP fractionation.

(ii) Isopycnic ultracentrifugation. MP₃₀ and MP₁₀₀ were further fractionated by ultracentrifugation of flotation in isopycnic gradient, to separate the MP₃₀ and MP₁₀₀ fractions into subclasses differing by their apparent density [67]. Samples of MP₃₀ or MP₁₀₀ in PBS were placed at the bottom of a preformed linear sucrose-D₂O gradient (10 ml total volume; 0.25 to 2.5 M sucrose). The 2.5 M sucrose solution was made in D₂O buffered to pH 7.2 with NaOH, and the 0.25 M sucrose solution was made in 10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 5.7 mM Na₂EDTA. The gradients were centrifuged for 18 h at $100,000\times g$ in a Beckman SW41 rotor. Fractions of 0.4 ml were collected from the top, and density measured by weighing 100 µl-aliquots, using a precision scale. Fractions were pooled according to their apparent density, and three pools were constituted: MPs of low density (MP₃₀LD and MP₁₀₀LD, respectively) corresponded to pooled fractions 1–7, with densities (ρ) ranging from 1.06 to 1.14 (mean ρ : $\rho_m = 1.10$), MPs of intermediate density (MP₃₀ID and MP₁₀₀ID) to fractions 8–14 ($1.14 \leq \rho \leq 1.18$; $\rho_m = 1.16$), MPs of high density (MP₃₀HD and MP₁₀₀HD) to fractions 15–21 ($1.18 \leq \rho \leq 1.25$; $\rho_m = 1.21$). Pooled fractions were diluted with 5 vol PBS, and MP₃₀ pelleted by ultracentrifugation for 2 h at $30,000\times g$ and 4°C , and MP₁₀₀

pelleted by ultracentrifugation for 2 h at $100,000\times g$ and 4°C . Pelleted MPs were resuspended in 200 µl PBS, further analyzed by flow cytometry, and stored at 4°C before use in our experiments of MP-mediated cell transfer of GFP-CFTR protein.

MP Titration

(i) Titer in total MPs. Quantification of the total MP content in samples resuspended in PBS was determined by flow cytometry, using a FACSCanto™ II cytometer and the DIVA6 software (Becton Dickinson Biosciences). The CountBright™ Absolute Counting Beads kit (Invitrogen Catalog # C-36950) and the Flow Cytometry Size Calibration kit (Nonfluorescent Microspheres; Invitrogen Catalog # F-13838) were used for the calibration of MP number and size, respectively. A total of 20,000 events was acquired for each sample for the calculation of the titer in total MPs.

(ii) Titer in bioactive MPs: MP-CAR, MP-CD46 and MP-GFP-CFTR. The proportion of MPs which displayed CAR, CD46 or GFP-CFTR at their surface and were potential conveyors of functional molecules was also determined by flow cytometry, using CAR or CD46 antibodies. For MP-GFP-CFTR, both GFP signal of the tagged CFTR protein and anti-CFTR antibody were used for flow cytometry analysis. The titer in CAR-, CD46 or GFP-positive MPs/ml was the one taken into account for MP-mediated cell transduction.

MP-mediated Transfer of CAR, CD46 or GFP-CFTR into Target Cells

Samples of CHO cell monolayers (5×10^5 cells/well) were incubated with 200 µl-aliquots of MP-CAR, MP-CD46 or MP-GFP-CFTR suspensions in PBS mixed with prewarmed serum-free medium, at a constant transducing dose of 5 MPs per cell. After 2 h MP-cell interaction at 37°C , the 200 µl-mix was removed and replaced by 500 µl of prewarmed complete medium. The cells were further incubated for 48 h at 37°C , and assayed for newly acquired functions, i.e. permissiveness to adenovirus, resistance to complement induced apoptosis, GFP signal, or chloride channel activity. MP-transduced cells were taken at 72 h after MP interaction, and incubated with HAdV5-GFP or HAdV5F35-GFP at 500 vp/cell. GFP-expression was monitored in live cells using a Zeiss Axiovert-135 inverted microscope (magnification: $\times 20$) equipped with an AxioCam digital camera. Cells were then harvested at 48 h pi, and GFP expression quantitated using flow cytometry.

CD46 Anti-complement Activity

MPs isolated from the culture medium of CHO cells (negative control MP-CHO) or CHO-CD46 (MP-CD46) were incubated with aliquots of recipient CHO cells for 2 h at 37°C and 5% CO₂, as above described. The culture medium was then removed and replaced by fresh medium containing complement fraction C3 (Sigma-Aldrich) at the concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL, and cells further incubated for 48 h. The degree of cell apoptosis was measured by flow cytometry, using the Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

PCR Analysis

(i) Real-time RT-PCR quantification of GFP-CFTR-encoding mRNA. Total RNA was extracted from MPs released from GFP-CFTR-expressing cells, or from MP-GFP-CFTR-transduced cells, using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel). Aliquots of 1 µg RNA was reverse transcribed using the

SuperScriptTM III First Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen) and real-time PCR was performed using the LightCycler and a LightCycler DNA Master SYBR Green I kit (Roche). Quantitative real-time PCR was performed using an antisense primer designed from the 5' end of the CFTR gene (nucleotide position 78 in the CFTR gene; 5'-GCGCTGTCTGTATCCTTTCTCAA) and a forward primer designed from the 3' end of the *GFP* gene (nucleotide position 621; 5'-AACGAGAAGCGCGATCATG). The PCR-amplified fragment was 196 nucleotides in length and overlapped the GFP and CFTR junction sequence [66].

(ii) GFP-CFTR DNA. The *GFP-CFTR* gene carried by the pCEP4-GFP-CFTR plasmid vector was detected using the same primers as above, on the host cell genomic DNA substrate obtained using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen).

CFTR Channel Function Assayed by Membrane Potential-sensitive Oxonol Probe and Cell Imaging

The fluorescent voltage sensitive probe bis(1,3-dialkylthiobarbituric acid)oligomethine oxonol (DiSBAC₂(3)) was used as previously described [65]. In brief, cells were loaded for 30 min with 100 nM DiSBAC₂(3) in a normal chloride solution containing 136 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM glucose and 10 mM Hepes (pH 7.4). Cells were then superfused with DiSBAC₂(3) in a low chloride solution, whereby NaCl was replaced by sodium gluconate, and supplemented with a cAMP cocktail consisted of 200 μ M dibutyl-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate, 200 μ M of 4-chlorophenylthio-cAMP, 20 μ M Forskolin and 50 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine. Fluorescent cells were viewed on an inverted TMD300 microscope (Nikon AG, Kürsnacht, Switzerland) equipped with a high-sensitivity black and white CoolSNAP HQ2 CCD camera (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany). DiSBAC₂(3) was excited at 546 nm with a 100-W xenon lamp and the emitted fluorescence was collected through a 580 nm barrier filter. Images were captured every 10 sec, stored and processed using Metafluor version 8.01 software (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). Regions of interest were delineated for up to 30 cells and changes in the fluorescent signal measured in each region were expressed as the F_t/F_0 ratio, in which F_t and F_0 were the fluorescence values at the time t and at the time when the cAMP cocktail was added, respectively. The cell-permeable glycyl hydrazine compound (GlyH-101; Calbiochem) was used as a selective inhibitor of CFTR at 20 μ M.

Chemicals and Antibodies

Cycloheximide was purchased from Boehringer (Mannheim, Germany). DiSBAC₂(3) was purchased from Invitrogen. Monoclonal antibodies against VSV-G (clone P5D4), human CD46 (clone 122-2) and human CAR (clone 3C100) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Polyclonal antiserum against human, mouse, rat, bovine, equine, canine and porcine TSG101 (ref. M-19, from goat), and against human, mouse, rat, canine and porcine CD63 (ref. H-193, from rabbit) were also purchased from Santa Cruz Biotechnology. Alexa Fluor[®] 568-conjugated goat anti-mouse IgG antibody were purchased from Invitrogen. The 10-nm colloidal gold-tagged goat anti-mouse IgG antibody was purchased from British Biocell International Ltd (Cardiff, UK). The anti-human CFTR antibody (LS-C14758-LSBio; LifeSpan-Biosciences, UK) was a mouse monoclonal IgM directed against an epitope located within the first extracellular loop, spanning amino acid residues 103–117. Alexa Fluor[®] 568-conjugated goat anti-mouse IgM was purchased from Invitrogen.

Viral Vectors

(i) Adenoviral vectors. HAdV5-GFP and HAdV5F35-GFP vectors have been described in previous studies [36,55,64]. The capsid of HAdV5F35-GFP consisted of hexon and penton base capsomers of HAdV5, and of chimeric fibers made up of the shaft and knob domains of serotype 35 fiber (F35) fused to HAdV5 fiber tail. Chimeric vector HAdV5F35-GFP-CFTR has been previously described [66]. HAdV5F35-GFP-CFTR encoded the wild-type (wt) allele of the *CFTR* gene fused to the 3' end of the *GFP* gene. Vector stocks were produced and titrated on HEK-293 cell monolayers [82].

(ii) Baculoviral vector AcMNPV-VSV-G. The coding sequence for the glycoprotein G of vesicular stomatitis virus (VSV-G) was inserted into the genome of *Autographa californica* Multi-Capsid NucleoPolyhedrosis Virus (AcMNPV) in the polyhedrosis gene locus, under the control of the CMV immediate-early promoter. The infectious titer was determined by the plaque assay method in Sf9 cells, and expressed as plaque-forming units per mL (pfu/mL). The titer in physical virus particles of AcMPV-VSV-G vector was determined by adsorbance measurement at 260 nm (A^{260}) on 1-mL samples of SDS-denatured virions (0.1% SDS for 1 min at 56°C) in 1-cm pathlength cuvette, using the following formula: A^{260} of 1.0 = 0.3×10^{12} vp/mL, considering the length of 134 kbp for the viral genomic DNA. Infectious titers of stocks of AcMPV-VSV-G concentrated by ultracentrifugation were usually 5×10^9 to 1×10^{10} pfu/mL, and the corresponding physical particle titers ranged between 1×10^{12} and 5×10^{12} vp/mL [36].

Electron Microscopy

(i) Negative staining of MPs. Samples were applied to carbon-coated grid and negatively stained with 1% uranyl acetate, pH 7.5. They were examined under a Jeol JEM-1400 electron microscope (EM), equipped with an ORIUSTM digital camera (Gatan France, 78113-Grandchamp).

(ii) Immunogold staining of MPs. Samples of MP suspension (10 μ L) were deposited on top of carbon-coated grids. 30 sec later, the excess of liquid was removed by blotting with filter paper. 10 μ L of a 50-fold diluted solution of primary antibody (anti-CAR or anti-CD46) was placed on the grid and incubated for 2 min at room temperature. The antibody solution was then removed by filter paper adsorption, and replaced by 10 μ L Tris-buffered saline (TBS). After three steps of rinsing with TBS, grids were post-incubated with 10-nm colloidal gold-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (British BioCell International, Cardiff, UK; diluted to 1:50 in TBS) for 2 min at room temperature. The secondary antibody solution was then removed by filter paper adsorption, and replaced by 10 μ L of stain (2% uranyl acetate, pH 7.4). After a further 1 min, the grid was dried on filter paper, and examined under the EM as above.

(iii) EM analysis of MP-adenovirus complexes and cell sections. Samples of MPs incubated with adenoviral vectors, with or without postincubation with target CHO cells, were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), pelleted, and post-fixed with osmium tetroxide (1% in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4). The specimens were dehydrated and embedded in Epon resin and sectioned. Sections were stained with 7% uranyl acetate in methanol, post-stained with 2.6% alkaline lead citrate in H₂O, and examined under the EM as above.

Statistics

Results were expressed as mean \pm SEM of n observations. Sets of data were compared with an analysis of variance (ANOVA) or a Student's t test. Differences were considered statistically significant

when $P < 0.05$. Symbols used in figures were (*) for $P < 0.05$, (**) for $P < 0.01$, (***) for $P < 0.001$, and ns for no significant difference, respectively. All statistical tests were performed using GraphPad Prism version 4.0 for Windows (Graphpad Software).

Supporting Information

Figure S1 Schematic procedure for MP isolation and fractionation.

(TIFF)

Figure S2 Influence of VSV-G-pseudotyping on the efficiency on the efficiency of MP-mediated transfer of CAR and CD46. (a), The effect of the fusigenic VSV-G glycoprotein on the efficiency of CAR transfer was evaluated by the degree of CHO permissiveness to the HAdV5-GFP vector. Aliquots of CHO cells were incubated with MP₃₀CAR at different MP doses per cell, as indicated in the x-axis. At 72 h after MP₃₀CAR interaction, cells were infected with HAdV5-GFP vector. Adenoviral vector HAdV5F35-GFP, which does not recognize CAR as cellular receptor, was used as the negative control. (b), The effect of VSV-G on the efficiency of CD46 transfer was evaluated by the degree of CHO permissiveness to the HAdV5F35-GFP vector. Aliquots of CHO cells were incubated with MP₃₀CD46 at different MP doses per cell, as indicated in the x-axis. At 72 h after MP₃₀CD46 interaction, cells were infected with HAdV5F35-GFP vector. Adenoviral vector HAdV5-GFP, which does not recognize CD46 as cellular receptor, was used as the negative control. In (a) and (b), MP₃₀ lacking CAR or CD46 and carrying VSV-G alone were used as negative controls for CAR and CD46 receptor activity, respectively. (EPS)

Figure S3 Cellular localization of GFP-tagged CFTR glycoprotein in MP-donor and MP-recipient CHO cells.

References

- György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, et al. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68: 2667–2688.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73: 1907–1920.
- Mause SF, Weber C (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107: 1047–1057.
- Meekes DGJ, Raab-Traub N (2011) Microvesicles and viral infection. *J Virol* 85: 12844–12854.
- Stepień E, Kablak-Ziembicka A, Czyż J, Przewłocki T, Malecki M (2012) Microparticles, not only markers but also a therapeutic target in the early stage of diabetic retinopathy and vascular aging. *Expert Opin Ther Targets* 16: 677–688.
- Dainiak N, Riordan MA, Strauss PR, Feldman L, Kreczko S (1988) Contractile proteins participate in release of erythroid growth regulators from mononuclear cells. *Blood* 72: 165–171.
- Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, et al. (2010) Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS ONE* 5: e15353.
- Beyer C, Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6: 21–29.
- Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A (2006) Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 48: 180–186.
- Boulanger CM (2010) Microparticles, vascular function and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 177–180.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, et al. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654–659.
- Pap E, Pállinger E, Pásztói M, Falus A (2009) Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res* 58: 1–8.
- Shet AS (2008) Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag* 4: 769–774.
- Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, R N (2004) Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 34: 392–401.
- Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, et al. (2002) Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 30: 450–459.
- Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, et al. (2009) Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med* 206: 1913–1927.
- Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, et al. (2000) Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus infection. *Nature Med* 6: 769–775.
- Chaput N, Taïeb J, Schartz N, Flament C, Novault S, et al. (2005) The potential of exosomes in immunotherapy of cancer. *Blood Cells Mol Dis* 35: 111–115.
- Ahn YS, Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ (2008) Cell-derived microparticles: a mediator of inflammation in aortic valve stenosis? *Thromb Haemost* 99: 657–658.
- Taïeb J, Chaput N, Zitvogel L (2005) Dendritic cell-derived exosomes as cell-free peptide-based vaccines. *Crit Rev Immunol* 25: 215–223.
- Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Zembala M (2007) Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol Lett* 113: 76–82.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M (2005) Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology* 20: 22–27.
- Köppler B, Cohen C, Schlöndorff D, Mack M (2006) Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol* 36: 648–660.
- Hudrisier D, Bongrand P (2002) Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants onto T cells: molecular mechanisms and biological significance. *FASEB J* 16: 477–486.
- Joly E, Hudrisier D (2003) What is trogocytosis and what is its purpose? *Nature Immunol* 4: 815.
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Bidot CJ, et al. (2005) Endothelial microparticles (EMP) as vascular disease markers. *Adv Clin Chem* 39: 131–157.

27. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, et al. (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3: e3694.
28. Kesimer M, Scull M, Brighton B, DeMaria G, Burns K, et al. (2009) Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 23: 1858–1868.
29. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, et al. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10: 1470–1476.
30. Vickers KC, Remaley AT (2012) Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol* 23: 91–97.
31. Bebawy M, Combes V, Lee E, Jaiswal R, Gong J, et al. (2009) Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia* 23: 1643–1649.
32. Lenassi M, Cagny G, Liao M, Vaupotic T, Bartholomeeusen K, et al. (2010) HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic* 11: 110–122.
33. Liu R, Klich I, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK (2009) Erythrocyte-derived microvesicles may transfer phosphatidylserine to the surface of nucleated cells and falsely 'mark' them as apoptotic. *Eur J Haematol* 83: 220–229.
34. Muratori C, Cavallin LE, Krätzel K, Tinari A, De Mito A, et al. (2009) Massive secretion by T cells is caused by HIV Nef in infected cells and by Nef transfer to bystander cells. *Cell Host Microbe* 6: 218–230.
35. Farley DC, Iqbal S, Smith JC, Miskin JE, Kingsman SM, et al. (2007) Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors – in vitro and in vivo implications. *J Gene Med* 9: 345–356.
36. Granio O, Porcherot M, Corjon S, Kitidee K, Henning P, et al. (2009) Improved adenovirus type 5 vector-mediated transduction of resistant cells by piggybacking on Coxsackie B-adenovirus receptor-pseudotyped baculovirus. *J Virol* 83: 6048–6066.
37. Guibinga GH, Friedmann T (2005) Baculovirus GP64-pseudotyped HIV-based lentivirus vectors are stabilized against complement inactivation by codisplay of decay accelerating factor (DAF) or of a GP64-DAF fusion protein. *Mol Ther* 11: 645–651.
38. Guibinga GH, Miyahara A, Esko JD, Friedmann T (2002) Cell surface heparan sulfate is a receptor for attachment of envelope protein-free retrovirus-like particles and VSV-G pseudotyped MLV-derived retrovirus vectors to target cells. *Mol Ther* 5: 538–546.
39. Okimoto T, Friedmann T, Miyahara A (2001) VSV-G envelope glycoprotein forms complexes with plasmid DNA and MLV retrovirus-like particles in cell-free conditions and enhances DNA transfection. *Mol Ther* 4: 232–238.
40. Sandrin V, Boulanger P, Penin F, Granier C, Cosset F-L, et al. (2005) Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *J Gen Virol* 86: 3189–3199.
41. D'Souza-Schorey C, Clancy JW (2012) Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev* 26: 1287–1299.
42. Benamer T, Andriantsitohaina R, Martinez MC (2009) Therapeutic potential of plasma membrane-derived microparticles. *Pharmacol Reports* 61: 49–57.
43. Arnberg N (2009) Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 19: 165–178.
44. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, et al. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320–1323.
45. Law LK, Davidson BL (2005) What does it take to bind CAR? *Mol Ther* 12: 599–609.
46. Tomko RP, Xu R, Philipson L (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B Coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3352–3356.
47. Gerlier D, Valentin H (2009) Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 163–191.
48. Gaggari A, Shayakhmetov DM, Lieber A (2003) CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature Med* 8: 746–755.
49. Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G, et al. (2003) Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 77: 9183–9191.
50. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP (2004) CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* 25: 496–503.
51. Grumelli S, Lu B, Peterson L, Maeno T, Gerard C (2011) CD46 protects against chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 6: e18785.
52. Walters RW, Grunst T, Bergelson JM, Finberg RW, Welsh MJ, et al. (1999) Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem* 274: 10219–10226.
53. Bradbury NA (1999) Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev* 79: S175–S191.
54. Chow YH, Plumb J, Wen Y, Steer BM, Lu Z, et al. (2000) Targeting Transgene Expression to Airway Epithelia and Submucosal Glands, Prominent Sites of Human CFTR Expression. *Mol Ther* 2: 359–367.
55. Granio O, Norez C, Ashbourne Excoffon KJ, Karp PH, Lusky M, et al. (2007) Cellular localization and activity of Ad-delivered GFP-CFTR in airway epithelial and tracheal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 631–639.
56. Mohamed A, Ferguson D, Seibert FS, Cai HM, Kartner N, et al. (1997) Functional expression and apical localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in MDCK I cells. *Biochem J* 322: 259–265.
57. Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23–45.
58. Guo Y, Su M, McNutt MA, Jiang Gu J (2009) Expression and distribution of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in neurons of the human brain. *J Histochem Cytochem* 57: 1113–1120.
59. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S (2006) Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87: 2767–2779.
60. Kowalski MP, Pier GB (2004) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J Immunol* 172: 418–425.
61. Buchholz CJ, Koller D, Devaux P, Mumenthaler C, Schneider-Schaulies J, et al. (1997) Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J Biol Chem* 272: 22072–22079.
62. Christiansen D, Devaux P, Réveil B, Evtashev A, Horvat B, et al. (2000) Octamerization enables soluble CD46 receptor to neutralize measles virus in vitro and in vivo. *J Virol* 74: 4672–4678.
63. Devaux P, Loveland B, Christiansen D, Milland J, Gerlier D (1996) Interactions between the ectodomains of haemagglutinin and CD46 as a primary step in measles virus entry. *J Gen Virol* 1477–1481.
64. Corjon S, Gonzalez G, Henning P, Grichine A, Lindholm L, et al. (2011) Cell entry and trafficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon:heparan sulfate interaction. *PLoS ONE* 6: e18205.
65. Coclet-Ninin J, Rochat T, Poitry S, Chanson M (2002) Discrimination between cystic fibrosis and CFTR-corrected epithelial cells by a membrane potential-sensitive probe. *Exp Lung Res* 28: 181–199.
66. Granio O, Ashbourne Excoffon KJD, Henning P, Melin P, Gonzalez G, et al. (2010) Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia. *Hum Gene Ther* 21: 1–19.
67. DaFonseca S, Blommaert A, Coric P, Hong SS, Bouaziz S, et al. (2007) The 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) derivative of betulinic acid (DSB) inhibits the assembly of virus-like particles in HIV-1 Gag precursor-expressing cells. *Antiviral Ther* 12: 1185–1203.
68. Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW (1991) Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352: 628–631.
69. Abe A, Miyahara A, Friedmann T (1998) Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *J Virol* 72: 6159–6163.
70. Roche S, Albertini AA, Lepault J, Bressanelli S, Gaudin Y (2008) Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell Mol Life Sci* 65: 1716–1728.
71. Roche S, Rey FA, Gaudin Y, Bressanelli S (2007) Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 315: 843–848.
72. Hudrisier D, Clemenceau B, Balor S, Daubeuf S, Magdeleine E, et al. (2009) Ligand binding but undetected functional response of FcR after their capture by T cells via trogocytosis. *J Immunol* 183: 6102–6113.
73. D'Halluin JC, Milleville M, Boulanger P (1980) Effects of novobiocin on adenovirus DNA synthesis and encapsidation. *Nucl Acids Res* 8: 1625–1641.
74. Benharrouga M, Haardt M, Kartner N, Lukacs GL (2001) COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J Cell Biol* 153: 957–970.
75. Heda GD, Tanwani M, Marino CR (2001) The Delta F508 mutation shortens the biochemical half-life of plasma membrane CFTR in polarized epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C166–174.
76. Bartoszewski R, Rab A, Twitty G, Stevenson L, Fortenberry J, et al. (2008) The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response. *J Biol Chem* 283: 12154–12165.
77. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, et al. (2010) Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 5: e11803.
78. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, et al. (2007) Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110: 2440–2448.
79. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, et al. (2006) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20: 847–856.
80. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, et al. (2009) Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One* 4: e4722.
81. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, et al. (1999) In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 104: 93–102.
82. Franqueville L, Henning P, Magnusson MK, Vigne E, Schoehn G, et al. (2008) Protein crystals in adenovirus type 5-infected cells: requirements for intranuclear crystallogenesis, structural and functional analysis. *PLoS One* 3: e2894.

Partie II

Validation du modèle en cellules humaines

1. Cellules donneuses d'EV

1.1. Les Calu-3

Les Calu-3 sont des cellules épithéliales pulmonaires qui expriment de manière constitutive le CFTRwt (§1.1.2.3 p94). Elles ont été choisies pour conserver une homogénéité tissulaire, les atteintes broncho-pulmonaires étant en effet la cause majeure de décès des patients atteints de mucoviscidose (§2.4.6.2 p53 et 2.4.6.3 p54). Il est intéressant de voir si elles sont capables, par l'intermédiaire des EV, de transférer suffisamment de protéine et/ou d'ARNm aux cellules cibles dépourvues de CFTRwt, les CF15 (§1.1.2.3 p94).

Des expériences de RT-PCR et de western blot ont été réalisées et témoignent respectivement de la présence d'ARNm et de protéine CFTR dans ces cellules (Figure 69 A & B). La fonctionnalité de la protéine est validée par un test utilisant une microélectrode spécifique des ions iodure (§2.3.2.4.1 p47 et 8.2 p115). Les cellules sont tout d'abord chargées en NaI, puis une cinétique est réalisée afin de suivre la sortie d'ions iodure, en présence ou non d'un cocktail d'activateurs du CFTR. Ce dernier est ajouté au temps 0. Dès 2 min, un pic est observé pour le test effectué sur les Calu-3, alors qu'aucun pic n'est observé pour le test effectué sur les CF-15 (Figure 69 C). Il témoigne de l'apparition spécifique d'ions I⁻ dans le milieu extracellulaire, et confirme la présence de CFTR fonctionnel en tant que canal à ions chlorure à la membrane des cellules Calu-3.

Cette expérience valide également la mise au point du test de fonctionnalité réalisée au laboratoire à partir du protocole d'Aleksandrov et de ses collaborateurs (Aleksandrov et al., 2010).

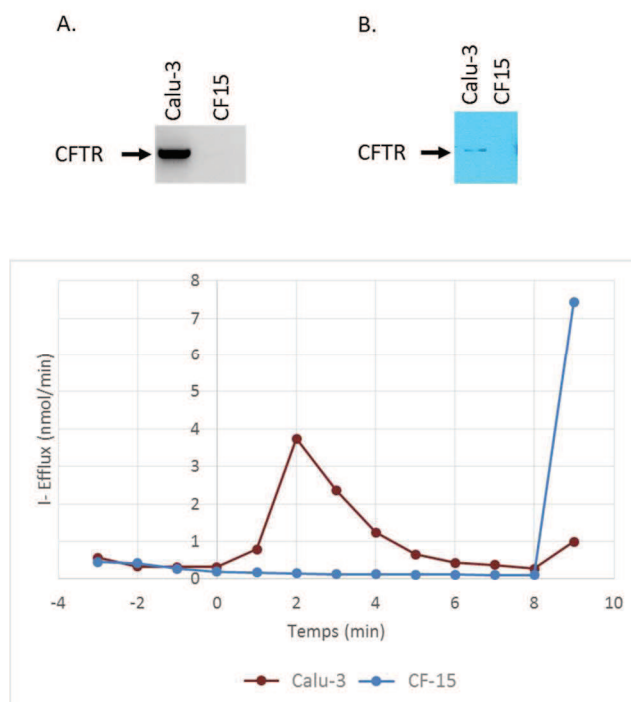


Figure 69. Caractérisation des cellules Calu-3
A. RT-PCR CFTR ; B. Western blot anti-CFTR
C. Test de fonctionnalité de la protéine CFTR en tant que canal à ions chlorure

1.2. Transfection par le plasmide épisomal pCEP4-EGFP-CFTR

Dans le but de transposer le modèle CHO aux cellules humaines, plusieurs lignées épithéliales pulmonaires telles que 16HBE, CFKM4, ou encore MM39 (§1.1.2.4 et 1.1.2.5 p94) ont été transfectées par le plasmide épisomal pCEP4-EGFP-CFTR (§1.2.2 p95). Ces transfections ont parfois conduit à l'obtention d'îlots de cellules fluorescentes vertes avec la présence d'un liseré à la membrane (Figure 70). Malheureusement, la fluorescence était très faible et ne se maintenait pas au cours du temps, ne permettant pas de les cultiver pour produire des EV.

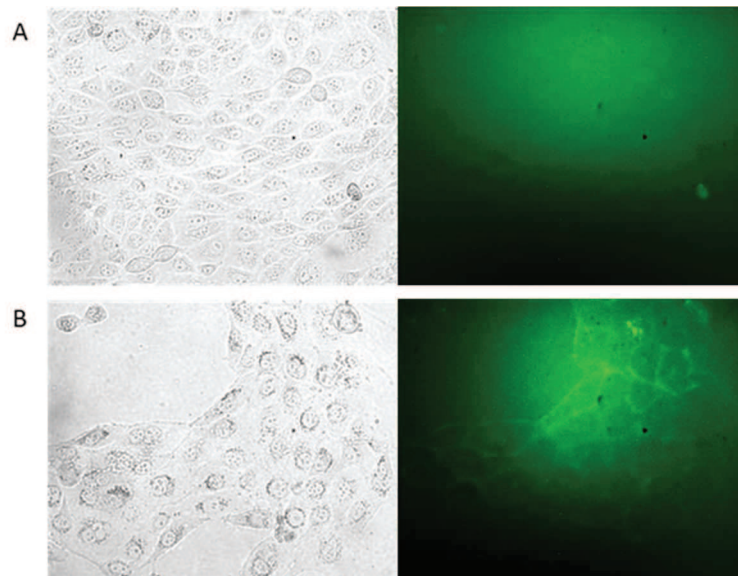


Figure 70. Clichés de microscopie à épifluorescence de 16HBE
A. Cellules naïves ; B. Cellules transfectées par pCEP4-EGFP-CFTR (OBJ x20)

Nous avons réussi à obtenir une lignée stable pour deux types cellulaires, A549 et HEK-293 (§1.1.2.2 p93 et 1.1.2.4 p94). Cette dernière a par ailleurs été triée par FACS avec succès, conduisant à une population présentant 98% de cellules fluorescentes vertes (Figure 71). Malheureusement, pour les deux lignées, la fluorescence était diffuse dans toute la cellule, laissant suggérer que la protéine de fusion GFP-CFTR était clivée. Une expérience de western blot utilisant un anticorps anti-GFP a révélé la présence d'une bande à la taille attendue pour la GFP mais par contre aucune pour la protéine de fusion GFP-CFTR (Figure 72 A & B), alors que l'ARNm était bien présent (Figure 72 C). Par ailleurs, une expérience de fonctionnalité de la protéine CFTR a été réalisée sur les A549-GFP-CFTR. Aucun pic représentant une sortie d'ions iodure et témoignant de la présence de la protéine fonctionnelle à la membrane n'a été observé (Figure 73). Ces résultats confirment que la protéine de fusion GFP-CFTR est indétectable dans ces cellules. Nous avons alors envisagé plusieurs stratégies alternatives afin d'obtenir des cellules donneuses d'EV-GFP-CFTR, et notamment l'utilisation du vecteur adénoviral Ad5-GFP-CFTR précédemment développé au sein de l'équipe.

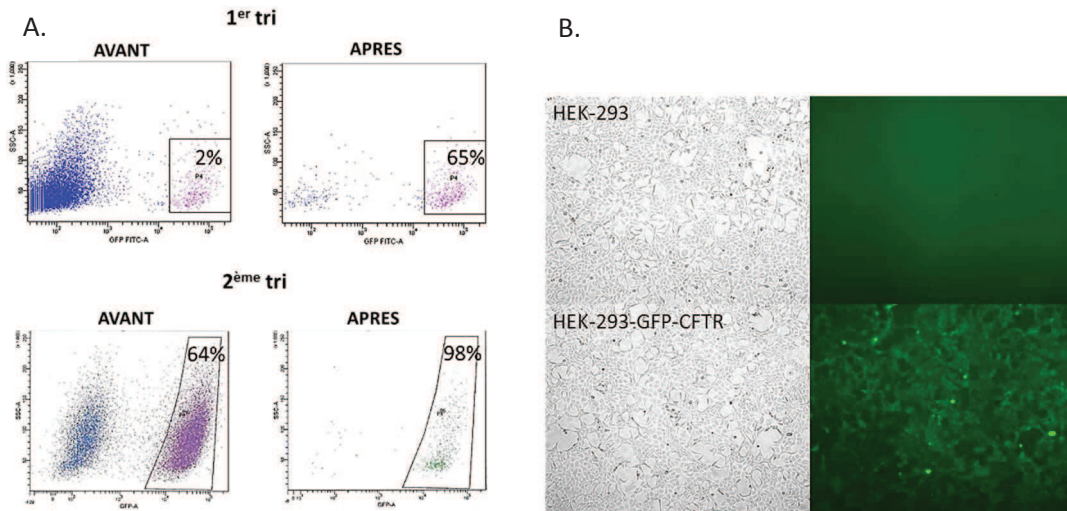


Figure 71. Etablissement de la lignée HEK-293-GFP-CFTR

A. Tri des cellules GFP+ par FACS ; B. Clichés de microscopie en contraste de phase et à épifluorescence (OBJ x5)

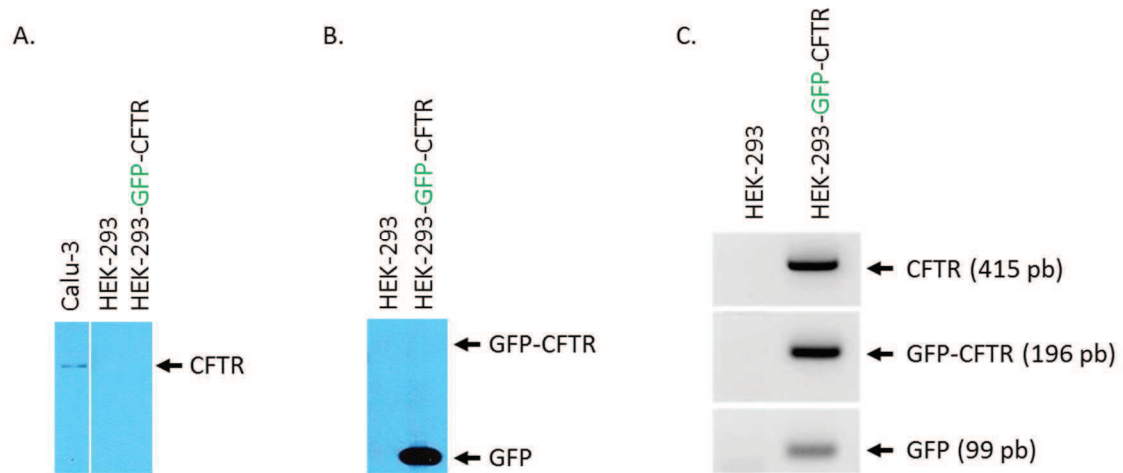


Figure 72. Caractérisation des cellules HEK-293-GFP-CFTR

A. Western Blot anti-CFTR ; B. Western Blot anti-GFP ; C. RT-PCR CFTR, GFP-CFTR et GFP

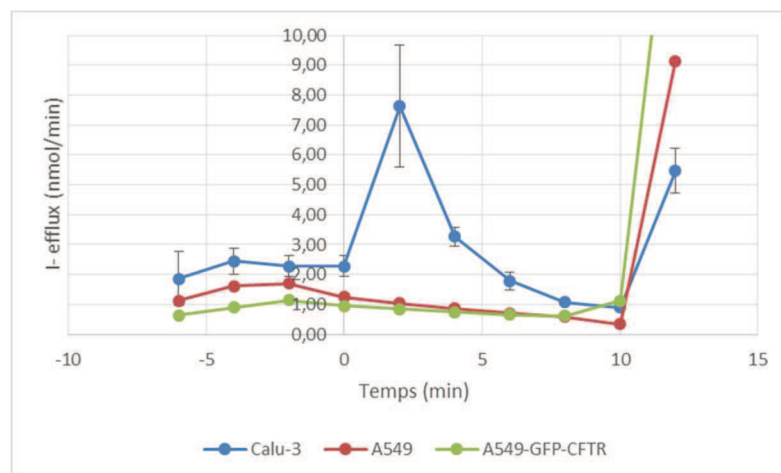


Figure 73. Caractérisation des cellules A549-GFP-CFTR

Test de fonctionnalité de la protéine CFTR en tant que canal à ions chlorure

1.3. Transduction par le vecteur adénoviral Ad5-GFP-CFTR

Ad5-GFP-CFTR est un vecteur qui a été créé par l'équipe de Pierre Boulanger et Saw-See Hong (§1.3.1 p95). Il est capable de générer une protéine de fusion GFP-CFTR stable et fonctionnelle en tant que canal à ions chlorure dans les cellules qu'il transduit (§1.B p85). Il a donc été choisi dans cette étude en alternative au plasmide pCEP4-EGFP-CFTR pour créer des cellules donneuses d'EV surexprimant le CFTR.

Afin de choisir la meilleure dose de vecteur permettant de transduire le maximum de cellules avec le minimum de toxicité, une étude de dose réponse a été réalisée en microplaque à 6 puits. La dose retenue est celle qui permet d'obtenir le maximum de cellules fluorescentes vertes sans induire de toxicité. La dose optimale nécessite d'attendre 48h pour observer des cellules fluorescentes vertes. Elle correspond à 50 PFU/cellules (MOI 50). Par ailleurs, la récolte ayant lieu durant plusieurs jours, cette étude est vérifiée dans le temps (Figure 74 A). Une analyse par cytométrie en flux des cellules à la fin des récoltes montre que 91% des cellules présentent une fluorescence verte (Figure 74 B).

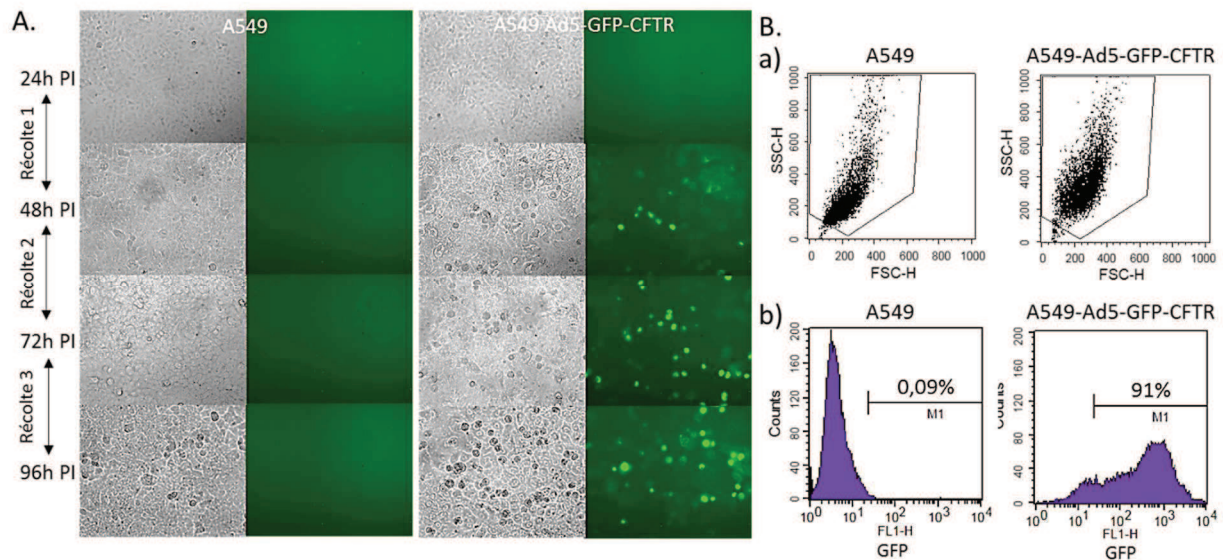


Figure 74. Etude des cellules A549-Ad5-GFP-CFTR dans le temps
 A. Clichés de microscopie à épifluorescence (OBJ x20)
 B. Caractérisation des cellules après production des vésicules : histogrammes de cytométrie en flux
 a) Granulosité des cellules en fonction de leur taille ; b) Pourcentage de cellules fluorescentes vertes

Une expérience de RT-PCR confirme la présence d'ARNm CFTR dans les cellules A549 transduites par ce vecteur (Figure 75 A). Des expériences de western blot témoignent de la présence majoritaire de la protéine de fusion GFP-CFTR (Figure 75 B & C), dont la quantité est estimée 10 à 30 fois supérieure à celle trouvée dans les Calu-3. Enfin, la Figure 75 D confirme que la protéine de fusion est fonctionnelle en tant que canal à ions chlorure. Des doses plus faibles de vecteur ne permettent pas de détecter une activité canal à ions chlorure. Ce résultat est dû à un effet de seuil, précédemment décrit (Granio et al., 2007) (Granio et al., 2010).

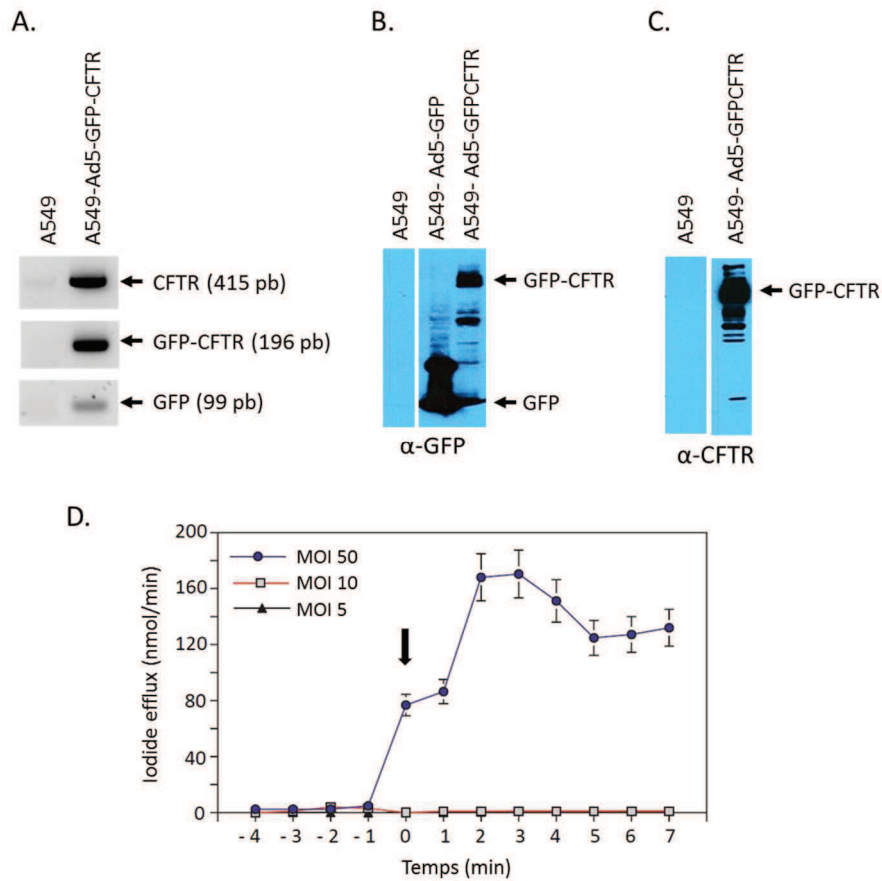


Figure 75. Caractérisation des cellules A549-Ad5-GFP-CFTR
A. RT-PCR CFTR ; B. Western blot anti-GFP ; C. Western blot anti-CFTR
D. Test de fonctionnalité de la protéine CFTR en tant que canal à ions chlorure

1.4. Transduction par le vecteur adénoviral Ad5-GFP

Pour finir, le vecteur Ad5-GFP est également utilisé dans cette étude, afin de comparer les résultats obtenus avec la protéine membranaire complexe GFP-CFTR, et son homologue simplifié et cytoplasmique la protéine GFP. La même étude dose réponse a été réalisée (Figure 76). Nous avons choisi la dose correspondant à une MOI de 20.

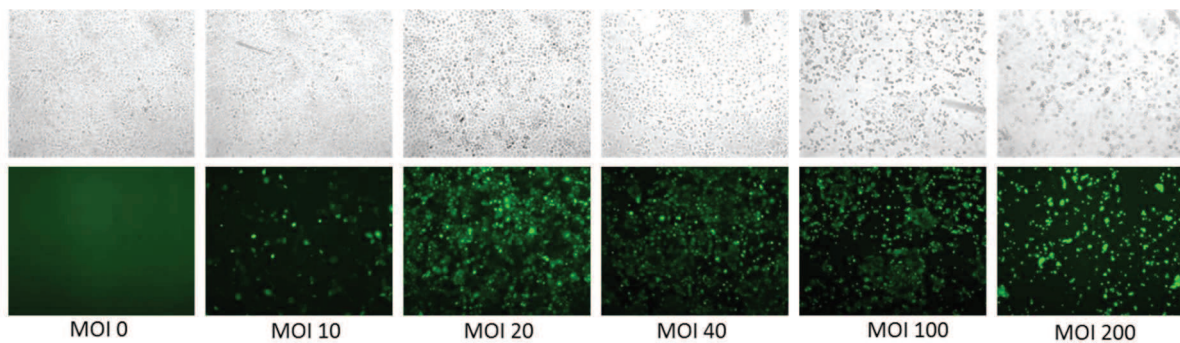


Figure 76. Dose-réponse du vecteur Ad5-GFP sur les A549
(OBJ x5)

2. Caractérisation des EV

2.1. Microscopie électronique à transmission

Les EV produites par les A549 ont été imagées par microscopie électronique à transmission en collaboration avec Constantin Ionut Matei. Les clichés présentés Figure 77 A & B montrent respectivement des vésicules hétérogènes, d'un diamètre de 200 à 1 200 nm caractérisant la population de MV, et des vésicules plus homogènes, d'un diamètre de 15 à 60 nm pour les Exo.

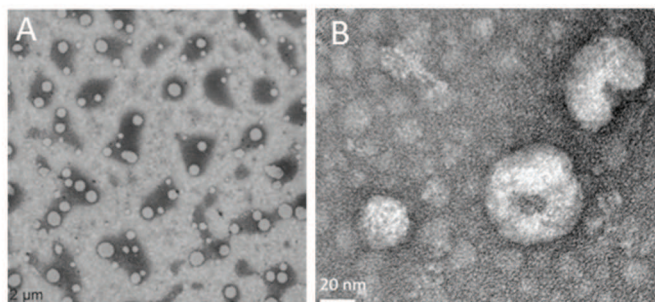


Figure 77. Clichés de microscopie électronique des EV produites par les A549
A. MV ; B. Exo

2.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les EV produites par les Calu-3 ont été analysées par diffusion dynamique de la lumière (§4.1 p108). Cette technique non quantitative nous permet d'obtenir une vue approximative de la population majoritaire qui est présentée Figure 78. Les EV sont de taille attendue, les MV allant de 100 nm à 1 μm avec un pic vers 320 nm, et les Exo de 30 à 150 nm avec un pic à 66 nm.

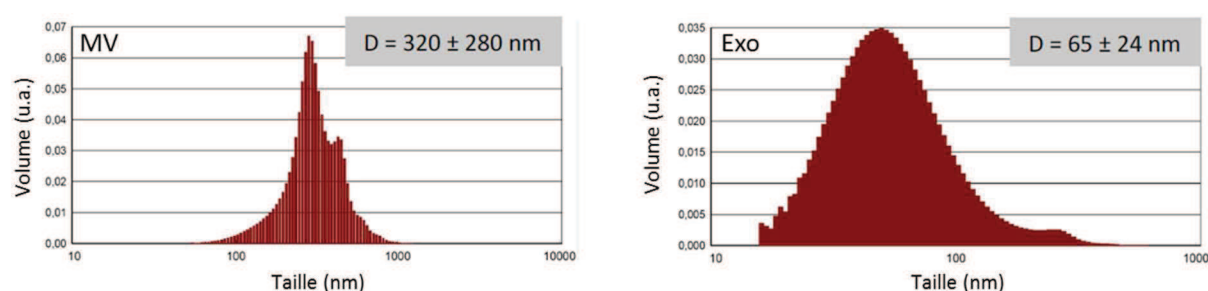


Figure 78. Diffusion dynamique de la lumière des EV produites par les Calu-3

2.3. Western blot anti-Tsg101 et anti-CD63

Les exosomes sont caractérisés par la présence de protéines ubiquitaires telles que Tsg-101 ou CD-63 (§3.2.3 p75) (Kesimer et al., 2009). Nous avons cherché à détecter ces protéines par western blot. La Figure 79 A présente les résultats obtenus avec l'anticorps anti-Tsg101 sur les EV issues des HEK293 et

montre la présence d'une bande à la taille attendue pour la fraction des exosomes correspondant au surnageant de culture (SN), alors qu'aucune bande n'est observée pour la fraction des exosomes correspondant au milieu naïf (M). Par ailleurs, aucune bande n'est observée pour les fractions de MV. Nous obtenons le même résultat avec l'anticorps anti-CD63 sur les EV-A549-Ad5-GFP-CFTR (Figure 79 B). Ainsi, le protocole de purification utilisé permet de séparer les MV des Exo de manière satisfaisante.

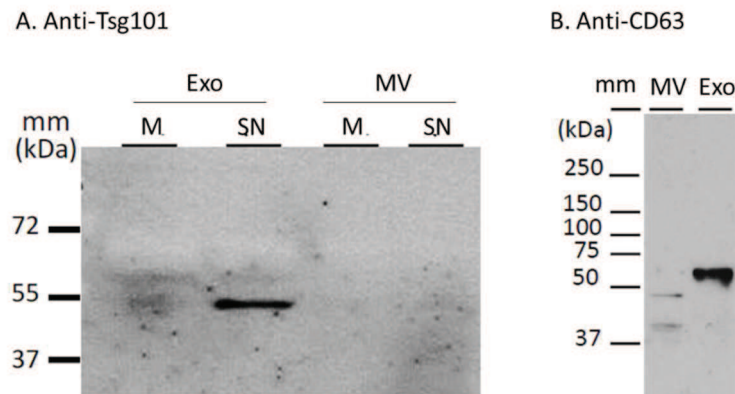


Figure 79. Western blots anti-Tsg101 et anti-CD63

A. Anti-Tsg101 réalisé sur les fractions MV et Exo purifiées à partir du surnageant de culture des HEK293 (SN) ou du milieu naïf (M) ; B. Anti-CD63 réalisé sur les MV et Exo produites par les EV-A549-Ad5-GFP-CFTR

2.4. Cytométrie en flux

Nous avons envisagé d'utiliser cette technique pour quantifier les EV. Elle présente cependant l'inconvénient d'avoir un seuil de détection qui n'est pas suffisamment bas pour détecter toutes les EV (Nolan, 2015). Aussi, l'erreur que l'on fait n'est pas identique sur les deux populations qui sont caractérisées par une différence de taille. Il est envisageable de comparer deux populations de MV entre elles ou deux populations d'Exo entre elles, tout en sachant que l'on ne regarde qu'une partie de la population.

Afin de distinguer les EV du bruit de fond électronique, il existe des kits commerciaux qui permettent de complexer les EV à des billes grâce à une interaction antigène-anticorps. Cependant, cette approche est sélective des EV qui présentent l'antigène d'intérêt, ce qui élimine une partie de la population. Par ailleurs, les EV présentent des antigènes différents, mais également un encombrement stérique différent, ce qui ne nous permet pas d'utiliser ces kits pour comparer les populations d'EV.

Nous avons également pensé à rendre les vésicules fluorescentes afin de les distinguer du bruit de fond. Nous avons pour cela imaginé deux manières de marquer les EV, avec de l'acridine orange qui traverse les membranes biologiques et marque les acides nucléiques, mais aussi avec l'annexine V conjugué à un fluorochrome qui a une affinité pour les phosphatidylsérines du feuillet externe des EV (§3.2.3 p75). Les résultats obtenus avec l'acridine orange sont présentés Figure 80 et sont similaires pour l'annexine V. Ils montrent qu'il est possible de marquer les EV de cette manière, mais elles ne sont ni marquées entièrement ni de manière homogène. Par ailleurs, elles ne sont pas totalement démarquées du bruit de fond.

Nous concluons ainsi que la cytométrie en flux n'est, à ce jour, pas assez résolutive pour quantifier les EV de manière satisfaisante dans une fin de comparaison des MV et des Exo.

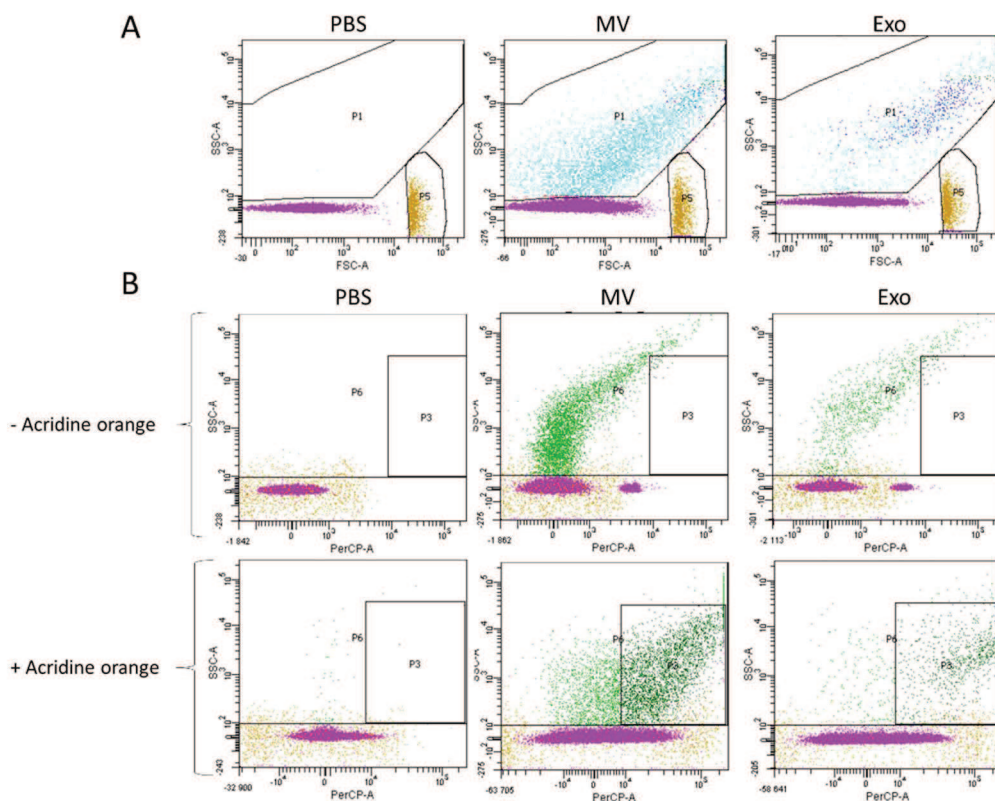


Figure 80. Cytométrie en flux d'EV A549-Ad5-GFP-CFTR marquées avec l'acridine orange

A. Granulosité en fonction de la taille : caractérisation du bruit de fond (PBS) et des populations de MV et d'Exo
B. Granulosité en fonction du canal fluorescent PerCP : caractérisation des vésicules marquées à l'acridine orange

2.5. Semi-quantification des EV

Dans une fin de semi-quantification, les EV ont finalement été analysées à l'aide de la technologie NTA et de l'appareil Nanosight. Cette technologie permet d'avoir une estimation de la quantité de particules présentes dans un échantillon donné (§4.2 p110). Le profil de taille obtenu pour les EV produites par les A549-Ad5-GFP-CFTR est présenté Figure 81. Les valeurs obtenues pour les Exo sont proches des valeurs attendues avec un pic à 93 nm et une moyenne à 114 nm. Les MV présentent un profil plus étalé avec notamment un épaulement vers les plus fortes tailles, témoignant de leur hétérogénéité. Leur nombre a été estimé à $4,92 \pm 0,96 \cdot 10^{10}$ particules/mL pour les MV-A549 et $10,8 \pm 2,1 \cdot 10^{10}$ particules/mL pour les Exo-A549. Pour les EV provenant des Calu-3, ces chiffres s'élèvent à $4,46 \pm 0,59 \cdot 10^{10}$ pour les MV et $8,14 \pm 1,35 \cdot 10^{10}$ pour les Exo. Pris dans leur ensemble, ces chiffres correspondent à une production de 200 MV et 300-400 Exo par cellule sur une période de 72h. Le titre des EV est de $2 \text{ à } 5 \cdot 10^8$ MV/ μ L et de $5 \cdot 10^8$ Exo/ μ L.

La concentration en protéines a été déterminée par le dosage de Bradford (§2.2 p102) et varie entre 0,25 et 0,5 μ g/ μ L, ce qui correspond à un ratio de $2 \cdot 10^8$ EV/ μ g de protéines. Cette valeur est en accord avec ce qui est obtenu dans la littérature (Webber and Clayton, 2013).

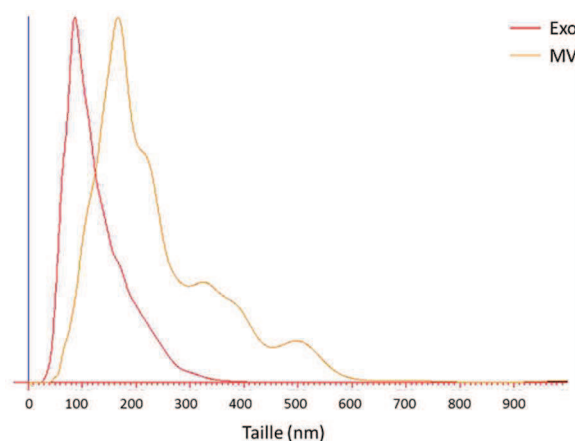


Figure 81. Profil de taille des EV-A549-Ad5-GFP-CFTR obtenu par la technologie NTA

2.6. Contenu des EV en matériel biologique d'intérêt

2.6.1. Contenu des EV en ARNm

Une expérience de RT-PCR a été réalisée sur les EV produites par les Calu-3 (§2.5 p105). Le résultat présenté Figure 82 montre la présence d'ARNm CFTR dans les deux fractions. Il semble y avoir 5 à 10 fois plus d'ARNm dans les MV que dans les Exo. Ceci pourrait être en adéquation avec la taille des vésicules. En effet, les MV étant plus grosses que les Exo, il est tout à fait envisageable qu'elles contiennent plus de matériel d'intérêt.

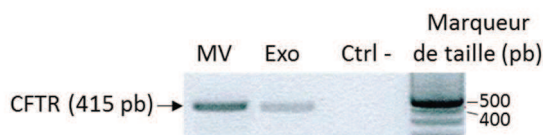


Figure 82. RT-PCR CFTR sur les EV produites par les Calu-3

Concernant les EV produites par les A549-Ad5-GFP-CFTR, nous avons remarqué que les cellules donneuses n'avaient pas encore atteint leur intensité de fluorescence maximale à 24h post-transduction (§1.3 p136). Aussi, nous nous sommes demandé si les EV produites durant cette période contenaient du matériel d'intérêt et devaient être conservées dans le *pool* de vésicules générées à 24, 48 et 72h. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une RT-PCR avec des amorces à cheval sur la séquence codant la GFP et le CFTR à partir d'échantillons d'ARN extraits d'EV produites à 24h, 48h et 72h (§2.5 p105). Les résultats présentés Figure 83 montrent que les trois fractions d'EV contiennent de l'ARNm GFP-CFTR. Ceci confirme que ces EV présentent un intérêt pour notre étude.

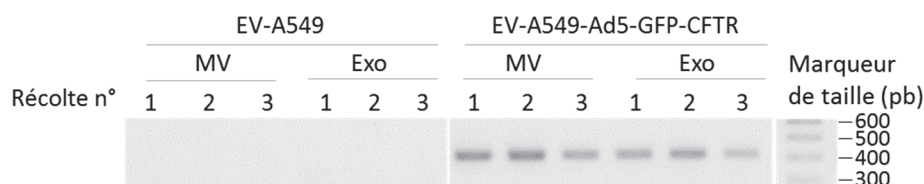


Figure 83. RT-PCR CFTR sur les trois fractions d'EV produites par les A549-Ad5-GFP-CFTR
1 : 24h, 2 : 48h, 3 : 72h

2.6.2. Contenu des EV en protéines

Des western blot ont été réalisés sur les EV produites par les cellules A549-Ad5-GFP-CFTR afin de détecter la protéine GFP-CFTR. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps anti-GFP et un anticorps anti-CFTR. Les deux blots montrent la présence de la protéine de fusion GFP-CFTR et ceci dans les deux fractions d'EV (Figure 84). Le signal obtenu pour les MV est estimé 10 à 20 fois supérieur à celui obtenu pour les Exo. Par ailleurs, une seule bande est détectée pour les Exo, de masse moléculaire 210-220 kDa, qui semble correspondre à la forme mature glycosylée de la protéine de fusion GFP-CFTR, alors que pour les MV, plusieurs bandes sont détectées, pouvant représenter différentes formes immatures du CFTR, ou encore des produits de dégradation.

Par ailleurs, les A549 transduites par les vecteurs adénoviraux Ad5-GFP et Ad5-GFP-CFTR présentent l'intérêt de générer des vésicules potentiellement fluorescentes vertes. Ceci permet d'envisager des expériences de cytométrie en flux afin de les caractériser. Les résultats présentés Figure 85 montrent que toutes les populations MV-GFP, MV-GFPCFTR, Exo-GFP et Exo-GFPCFTR présentent de la fluorescence verte. Par ailleurs, les populations EV-GFP présentent davantage d'EV GFP+ que la population EV-GFP-CFTR, respectivement 81 à 83% en moyenne contre 2 à 11%. Les différences de taille des protéines mais aussi de localisation pourraient expliquer cet écart. Ainsi, les petites protéines cytoplasmiques se retrouveraient préférentiellement dans les EV, contrairement aux grosses protéines membranaires. Cette différence pourrait également être expliquée par un *quenching* de fluorescence de la protéine GFP-CFTR du fait de sa proximité avec la membrane. Soulignons que les EV-GFP représentent un outil particulièrement intéressant pour l'étude du mécanisme de transfert puisque l'on peut suivre la population par sa fluorescence intrinsèque. Ce sont ces vésicules qui seront utilisées à cette fin.

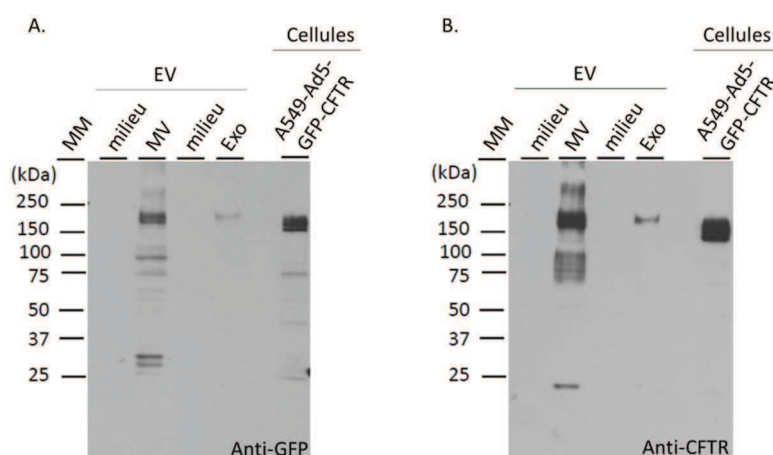


Figure 84. Western blot caractéristiques des EV-A549-Ad5-GFP et A549-Ad5-GFP-CFTR
A. anti-GFP ; B. anti-CFTR

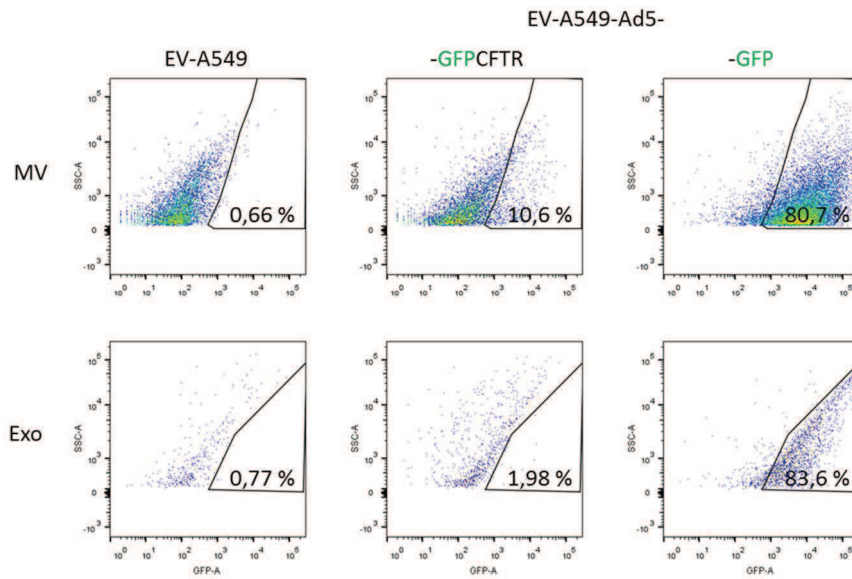


Figure 85. Cytométrie en flux d'EV produites par les A549 transduites par les vecteurs adénoviraux

2.7. Cytotoxicité des EV

Un test de cytotoxicité a été réalisé afin de s'assurer que les EV ne sont pas cytotoxiques pour les cellules. Ce dernier évalue le pourcentage de cellules vivantes grâce à une coloration mettant en jeu une enzyme mitochondriale (§1.4 p96). Les résultats présentés Figure 86 montrent que la viabilité des cellules décroît jusqu'à 60% pour les plus fortes doses de vésicules ($4 \cdot 10^4$ EV/cellule) déposées sur les A549. Elle se situe aux alentours de 80% pour des doses comprises entre $3 \cdot 10^4$ et $4 \cdot 10^4$ EV/cellule. Des doses plus faibles ne sont pas toxiques pour les cellules. Par ailleurs, les CF15 semblent plus tolérantes aux vésicules.

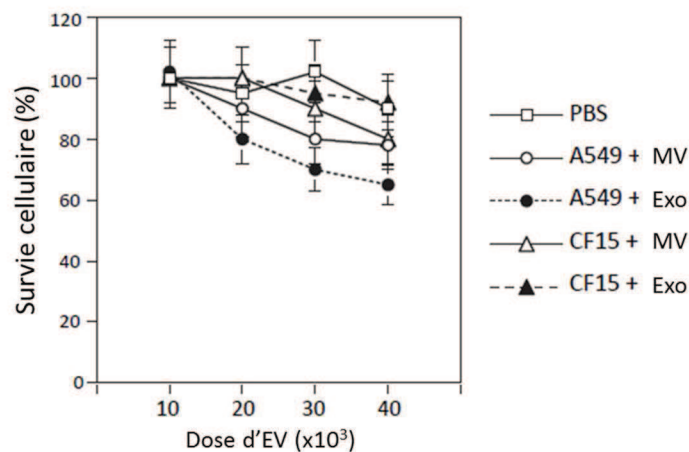


Figure 86. Test de cytotoxicité des EV sur les A549 et les CF15

2.8. Optimisation de la production des MV : ionophore du calcium

Le calcium étant un stimulateur de la production des MV (§3.2.2.1 p71), nous avons envisagé la possibilité d'utiliser un ionophore du calcium dans le but d'optimiser leur production. Nous avons choisi les cellules modèles BHK-CFTR-HA qui surexpriment la protéine CFTR-HA de manière constitutive (§1.1.2.6 p94). Les cellules sont incubées en présence ou non d'ionophore du calcium A23187 et les MV produites sont purifiées (§3 p107) puis analysées par cytométrie en flux afin de les semi-quantifier (§7 p112). Les résultats montrent que les MV produites avec stimulation sont effectivement plus nombreuses que celles produites sans stimulation et que l'effet est dose-dépendant (Figure 87). Une extraction d'ARN est alors réalisée sur ces vésicules et la présence d'ARNm CFTR a été recherchée par RT-PCR. En raison d'une quantité trop faible de matériel pour les populations de MV produites 1/2h sans stimulation ou en présence de 2,5 μ M d'A23187, cette expérience est réalisée uniquement sur les deux autres populations. Les résultats montrent que, malgré le fait qu'elles soient moins nombreuses, les MV produites 24h sans stimulation contiennent plus d'ARNm CFTR que celles produites en présence de 10 μ M d'A23187 durant 1/2h (Figure 88). Par ailleurs, une étude réalisée avec les MV produites par les CHO-GFP-CFTR montre également qu'il y a plus de MV fluorescentes vertes dans la population de MV produites 24h sans stimulation (Figure 89). Ces résultats préliminaires nous permettent de conclure que l'ionophore du calcium est efficace pour générer un plus grand nombre de MV mais que celles-ci sont moins intéressantes du point de vue de leur contenu. La capacité de l'ionophore à induire une forte production de MV en un temps réduit pourrait tout de même être exploitée afin de produire des vecteurs qui pourraient par la suite être modifiées *in vitro*. A cette fin et dans le but de s'assurer que ces vecteurs ainsi préparés ne sont pas toxiques pour la cellule, un test de cytotoxicité a été réalisé (§1.4 p96) en déposant 5.10^4 MV-A549-Ad5-GFP-CFTR/cellule cible A549. Malheureusement, les doses intéressantes de 5 et 10 μ M diminuent drastiquement le nombre de cellules cibles survivantes (Figure 90), compromettant l'utilisation de l'ionophore dans ces conditions.

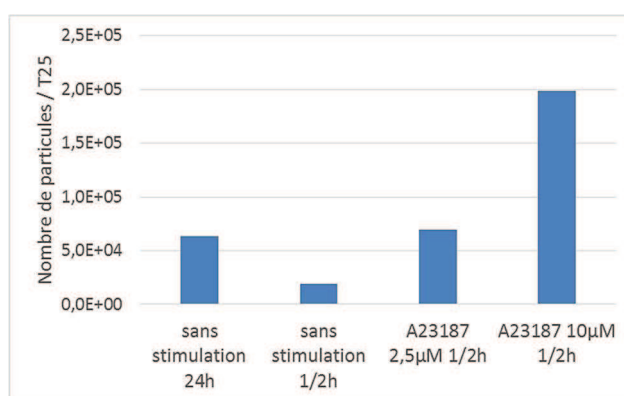


Figure 87. Semi-quantification des MV-BHK-CFTR-HA par cytométrie en flux

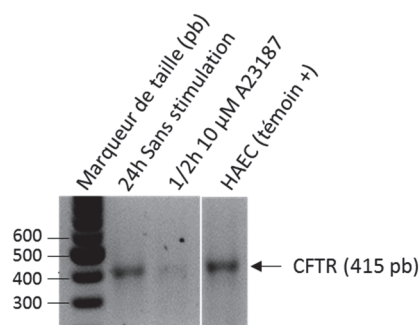


Figure 88. Détection d'ARNm CFTR dans les MV-BHK-CFTR-HA
Témoin + : HAEC (Human Airway Epithelial Cells)

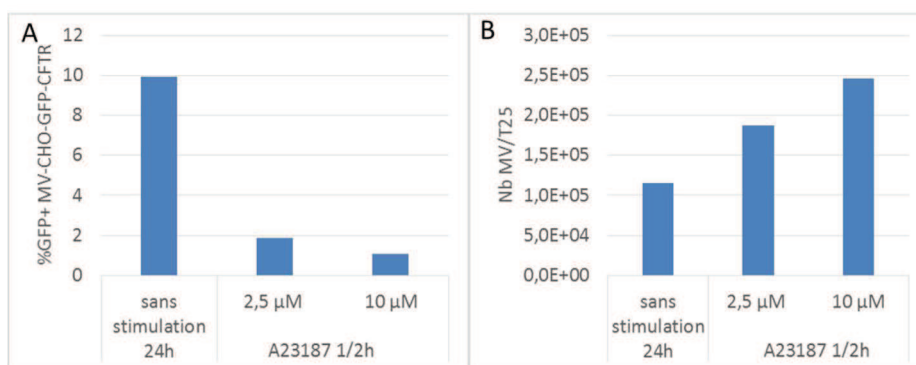


Figure 89. Détection de la protéine GFP dans les CHO-GFP-CFTR par cytométrie en flux
A. %GFP+ MV-CHO-GFP-CFTR ; B. Semi-quantification des MV

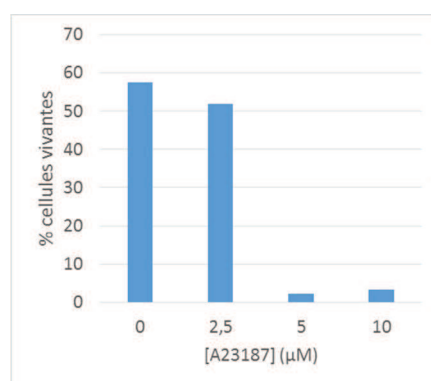


Figure 90. Test de cytotoxicité des MV-A549-Ad5-GFP-CFTR produites en présence d'ionophore du calcium A23187

3. Cellules cibles des EV

3.1. Etude de transfert et de fonctionnalité

3.1.1. Cellules cibles des EV produites par les Calu-3

Les Calu-3 expriment le CFTR de manière endogène et nous avons souhaité savoir s'il était possible de transférer du matériel génétique aux cellules cibles, en quantité suffisante pour apporter une nouvelle fonctionnalité aux CF15. Après avoir vérifié que l'ARNm CFTR était bien présent dans les vésicules (Figure 82 p141), une expérience de fonctionnalité de la protéine CFTR a été réalisée trois jours après traitement sur les CF-15, cellules cibles des EV Calu-3, à une dose de 200 EV/cellule. Les résultats de ce test ont révélé une sortie d'ions iodure témoignant de la présence de la protéine CFTR fonctionnelle à la membrane des cellules cibles (Figure 91 A). Le même test a été réalisé avec des EV produites par les CFKM4 qui expriment le CFTR muté (§1.1.2.5 p94) et aucun signal n'a été obtenu (Figure 91 B). Ceci conforte la spécificité du signal obtenu avec les EV-Cal-3 et fait la preuve de concept du transfert de matériel biologique CFTR aux cellules humaines par l'intermédiaire des EV. Le signal obtenu avec les EV-Cal-3 est toutefois 10 à 20 fois inférieur au signal obtenu avec les Calu-3 et nécessite d'être amélioré.

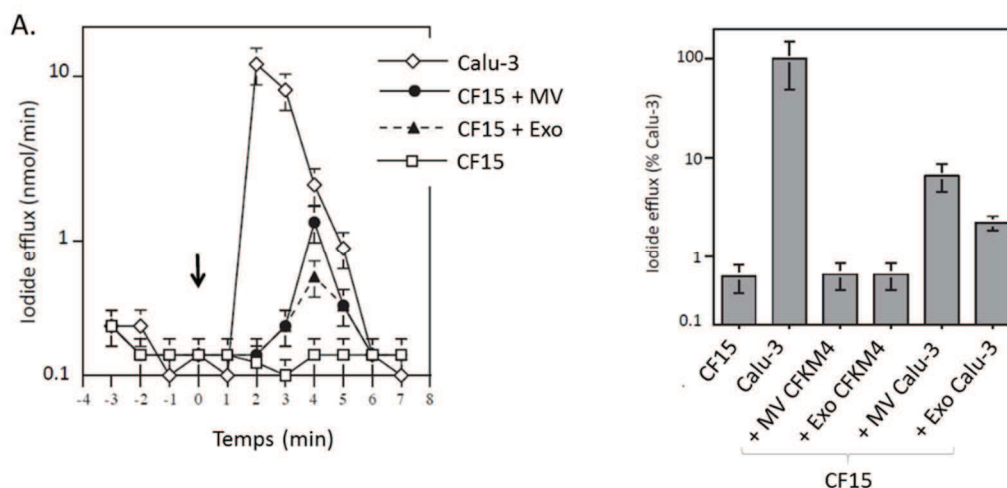


Figure 91. Test de fonctionnalité des CF15 cibles des EV Calu-3
A. Cinétique de sortie des ions iodeure ; B. Spécificité du signal obtenu

3.1.2. Cellules cibles des EV produites par les A549-Ad5-GFP-CFTR

Afin d'optimiser le transfert de la protéine CFTR aux cellules cibles, nous avons choisi d'utiliser un système qui nous permette de suivre la protéine d'intérêt par fluorescence grâce à la GFP fusionnée (§1.1.2.2 p93). Nous avons également travaillé sur les doses d'EV et la surexpression de la protéine d'intérêt dans les cellules donneuses d'EV grâce à une transduction par le vecteur adénoviral Ad5-GFP-CFTR (§1.3 p136).

3.1.2.1. Détection de la protéine

3.1.2.1.1. Dose-réponse

Une étude de dose-réponse a tout d'abord été effectuée sur les A549, à raison de 5.10^3 à 4.10^4 EV/cellule, après 6h d'incubation avec les vésicules. Les résultats de cytométrie en flux présentés Figure 92 montrent que le pourcentage de cellules vertes augmente avec la dose jusqu'à atteindre 40% pour les cellules traitées par la dose maximale de MV et 10 % pour celles traitées avec la dose maximale d'Exo. Ces résultats suggèrent que les MV sont plus efficaces que les Exo pour le transfert de la protéine GFP-CFTR.

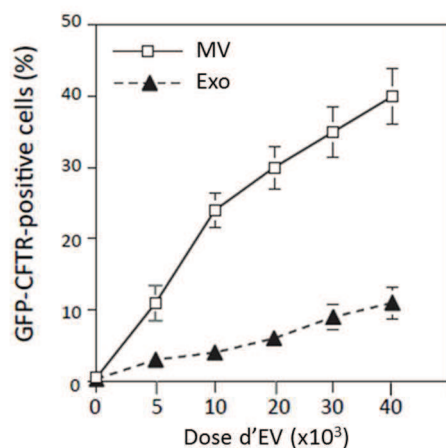


Figure 92. Dose-réponse des EV-A549-Ad5-GFP-CFTR sur les cellules cibles A549, étudiée par cytométrie en flux

3.1.2.1.2. Cinétique

Les EV-GFP-CFTR ont également été déposées sur les CF15, à une dose de $2 \cdot 10^4$ EV /cellule et une étude de cinétique a été réalisée sur plusieurs jours. La fluorescence des cellules a été analysée par cytométrie en flux à 6, 24, 48 et 72h. A 6h, 10 à 15% des cellules traitées par les MV sont fluorescentes vertes, contre 5 à 6 % pour les cellules traitées par les Exo. Nous remarquons que ce pourcentage est 3 fois moindre par rapport à celui obtenu avec les cellules cibles A549. Il diminue respectivement à 3% et moins de 2% à 12h, et augmente de nouveau progressivement jusqu'à atteindre 8 à 9% pour les MV et 5 à 6% pour les Exo à 48h (Figure 93). Ceci pourrait être le fait d'une néosynthèse de protéine d'intérêt à partir des ARNm transférés.

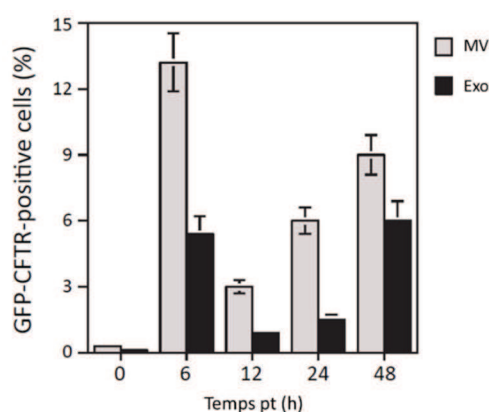


Figure 93. Suivi par cytométrie en flux du signal GFP dans les cellules cibles CF15 traitées par les EV-A549-Ad5-GFP-CFTR

3.1.2.2. Détection de l'ARNm et quantification relative

Une RT-PCR classique a permis de mettre en évidence la présence de l'ARNm GFP-CFTR dans les CF15, cellules cibles des EV-GFP-CFTR (Figure 94), et ce dès 6h. Il semblerait que les cellules cibles des MV contiennent plus d'ARNm GFP-CFTR que les cellules cibles des Exo. Une expérience de qRT-PCR a été mise en œuvre afin de quantifier ce résultat et confirme que les cellules cibles des MV contiennent environ 10 fois plus d'ARNm GFP-CFTR que les cellules cibles des Exos (Figure 95 A). Elle révèle également que la quantité double à 24h puis se stabilise à 48h pour les MV et diminue dès 48h pour les Exo. Cela signifie que les EV continuent d'être incorporées dans les 24 premières heures mais qu'à partir de 48 ou 72h, l'ARNm est peu à peu dégradé. Cela peut également provenir de l'épuisement du milieu en EV. Par ailleurs, la demi-vie intracellulaire de l'ARNm GFP-CFTR peut être estimée à 48h pour les MV et à 16h pour les Exo (Figure 95 B). Ce résultat suggère que les EV suivent une voie métabolique différente. Les molécules d'ARNm GFP-CFTR semblent plus stables dans les cellules transduites par les MV que dans celles transduites par les Exo.

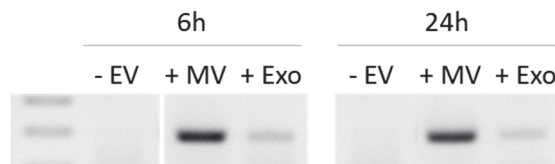


Figure 94. RT-PCR GFP-CFTR sur CF15, cellules cibles des EV A549-Ad5-GFP-CFTR

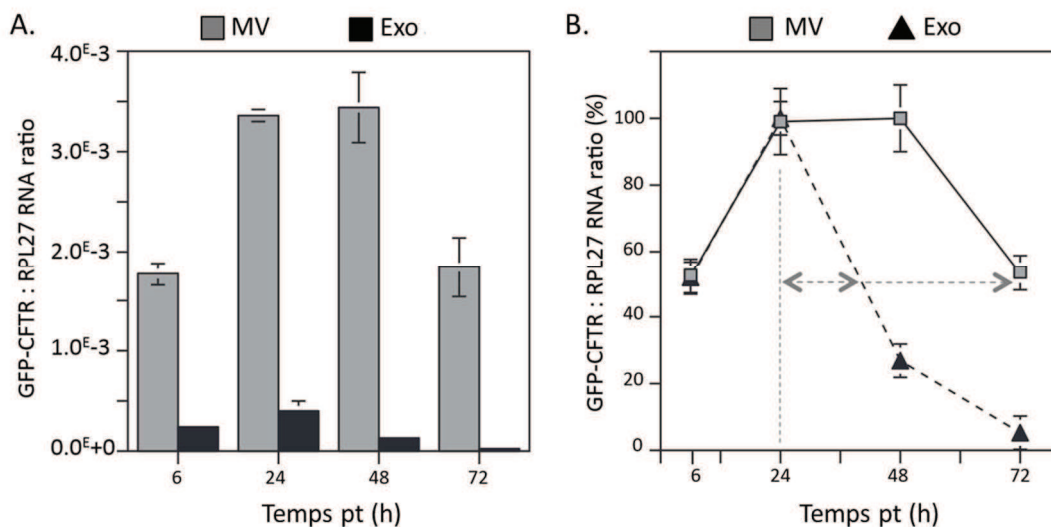


Figure 95. qRT-PCR GFP-CFTR sur CF15, cellules cibles des EV A549-Ad5-GFP-CFTR, en fonction du temps
A. Ratio ARNm GFP-CFTR / RPL27 ; B. Ratio normalisés à 100% par rapport à la plus forte valeur dans chacun des cas

3.1.2.3. Test de fonctionnalité de la protéine CFTR

Après avoir montré la présence de l'ARNm ainsi que de la protéine GFP-CFTR dans les cellules cibles des EV-GFP-CFTR, une question fondamentale subsiste : cette protéine est-elle présente à la membrane des cellules cibles et fonctionnelle en tant que canal à ions chlorure ? Des tests de fonctionnalité (§8.2 p115) ont été réalisés sur les CF15 après 24h d'incubation avec des doses

croissantes d'EV-GFP-CFTR allant de 1 à 4.10^4 EV/cellule. Un pic dose-dépendant correspondant à une sortie d'ions iodure est observé et témoigne de la fonctionnalité de la protéine GFP-CFTR présente dans les cellules cibles des EV (Figure 96). Le résultat est modeste pour une dose de 2.10^4 EV/cellule et très significatif pour une dose de 4.10^4 EV/cellule. De manière intéressante, les résultats sont similaires en présence de MV ou d'Exo, ce qui est contradictoire avec les résultats précédemment obtenus lors de la recherche de protéine par cytométrie en flux (Figure 93 p147) ou encore d'ARNm par qRT-PCR (Figure 94 et Figure 95 p148). Ceci nous amène à penser que le matériel biologique délivré aux cellules n'est pas forcément disponible pour la cellule cible, et que potentiellement les Exo seraient plus efficaces. Les MV pourraient être en partie séquestrées dans certains compartiments intracellulaires, les rendant fonctionnellement moins actives et expliquant le caractère plus stable de leur contenu en ARNm (§3.1.2.2 p148). Le contrôle positif de cette expérience correspond aux cellules CF15 transduites par l'Ad5-GFP-CFTR, qui présentent un fort signal à une dose de 50 PFU/cellule (Figure 75 D p137). Le pic obtenu pour les EV est 2 à 3 fois inférieur au signal obtenu avec le vecteur adénoviral. Par ailleurs, le signal est diminué seulement de 25 à 30% au troisième jour d'incubation avec les EV, et il est toujours détectable au 5^{ème} jour. Ainsi, le fait d'augmenter la dose de vésicules et également de travailler dans un système cellulaire qui surexprime la protéine d'intérêt permet d'obtenir des résultats très encourageants qui nous conduisent à imaginer de nombreuses perspectives.

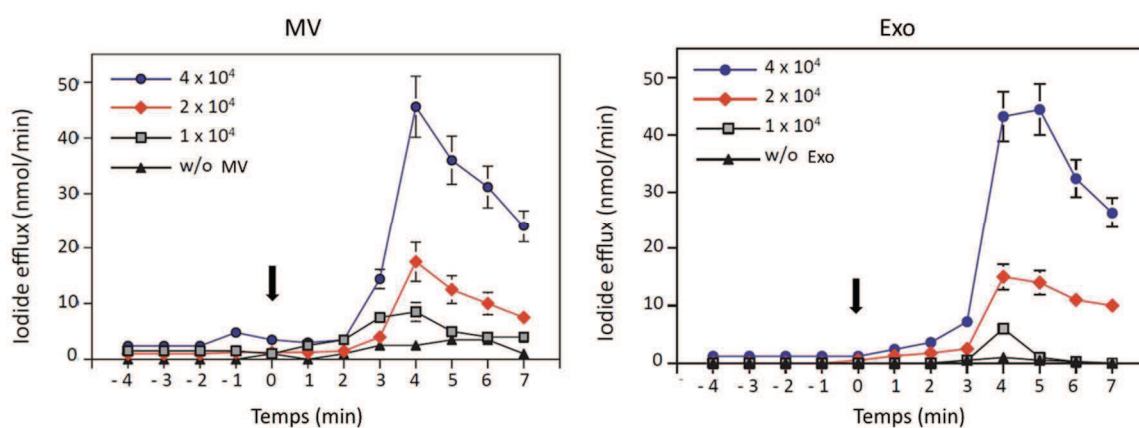


Figure 96. Test de fonctionnalité de la protéine GFP-CFTR dans les CF15, cellules cibles des EV-A549-Ad5-GFP-CFTR

3.2. Etude du mécanisme de transfert

Afin d'optimiser davantage l'efficacité des EV et notamment le rapport qualité/quantité, il est nécessaire de s'intéresser au mécanisme d'internalisation des EV. Les expériences réalisées dans le cadre de l'étude du mécanisme de transfert ont été réalisées avec les EV-GFP, puisque nous avons vu que plus de 80% d'entre elles sont fluorescentes vertes (§2.6.2 p142). Elles sont ainsi facilement traçables grâce à leur fluorescence intrinsèque.

3.2.1. Cinétique

Nous avons étudié la cinétique d'apparition d'un signal GFP dans les cellules cibles A549 (système homologue) et CF15 (système hétérologue). Les cellules cibles ont été étudiées par cytométrie en flux

à différents temps post-transduction, et également par microscopie à l'aide d'un axioplan. Les résultats sont présentés Figure 97. Après 3h d'incubation avec les MV, 60% des A549 sont fluorescentes vertes, ce pourcentage augmente progressivement jusqu'à 75% après 6h et on observe un plateau à 80% après 12h. Pour les Exo, ces chiffres sont respectivement de 5%, 10% et 25%. Ce résultat est confirmé par les clichés de microscopie où davantage de signaux sont observés dans les cellules traitées par les MV que celles traitées par les Exo. Quant aux cellules cibles CF15 (système hétérologue), les résultats montrent que l'efficacité de transduction est inférieure à celle obtenue en système homologue. Seulement 40% des cellules traitées par les MV sont fluorescentes vertes à 12h et cette valeur atteint 5% pour les Exos. Cette observation est en accord avec les résultats précédemment obtenus avec les EV-GFP-CFTR (§3.1.2.1.1p146 et 3.1.2.1.2 p147).

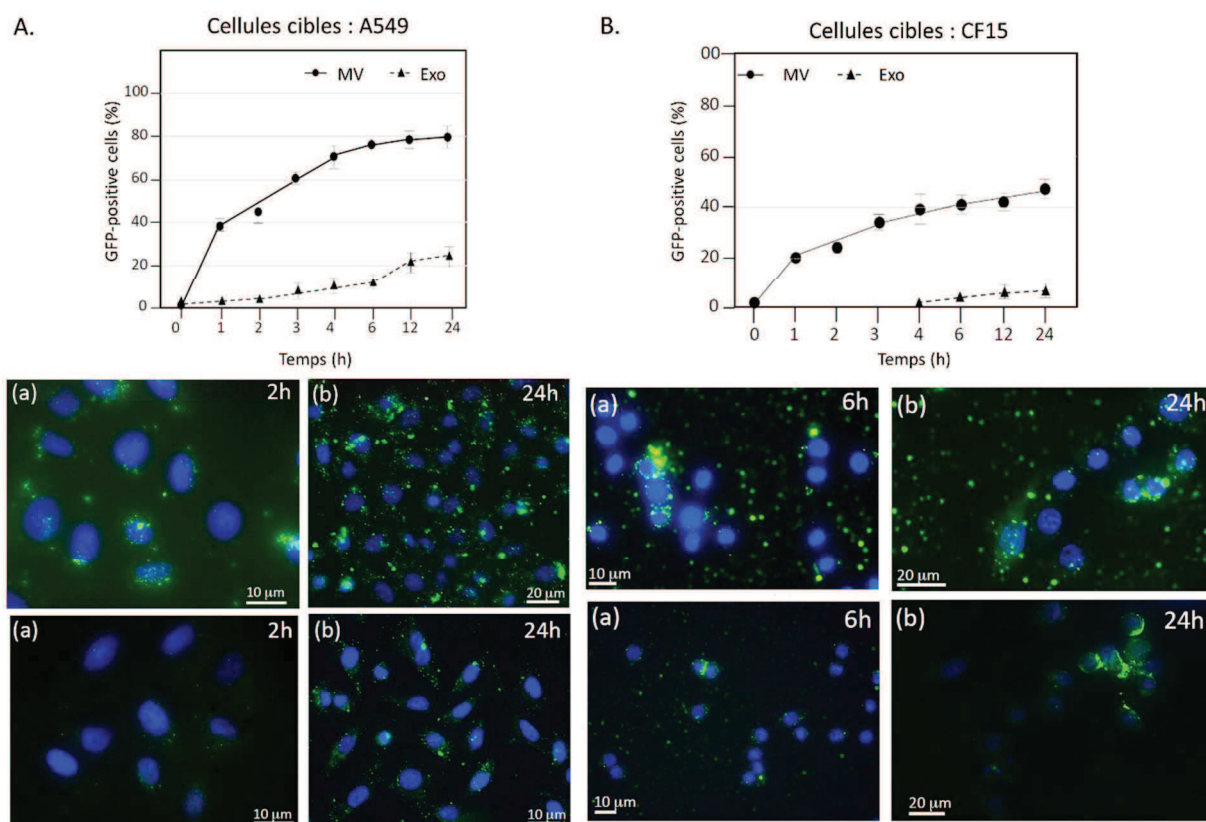


Figure 97. Cinétique et microscopie confocale des cellules A549 et CF15, cibles des EV-GFP

3.2.2. Inhibiteurs métaboliques

Différents inhibiteurs métaboliques ont été utilisés afin de bloquer différentes voies d'entrée dans la cellule et de déterminer le mécanisme de transfert employé par les EV (§5.1 p111). Les cellules ont d'abord été traitées durant 1h avec ces drogues puis elles ont été incubées 6h avec les EV puis fixées et analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés Figure 98 et montrent des différences entre les deux types cellulaires. Pour les A549, nous observons que les drogues qui bloquent la dégradation par les lysosomes, telles que la bafilomycine A1 et la chloroquine, entraînent une augmentation du pourcentage de cellules vertes. Ceci suggère que les EV entrent en réalité dans une majorité de cellules, et qu'elles sont en partie dégradées. Nous avons également imaginé que le

blocage des voies de dégradation par les lysosomes puisse entraîner une redirection des compartiments destinés à la fusion avec les lysosomes vers l'exocytose extracellulaire, relargant ainsi les EV et leur donnant une nouvelle chance d'entrer dans les cellules cibles. Par ailleurs, la cytochalasine B et l'amiloride entraînent une diminution du pourcentage de cellules vertes pour les MV, ce qui laisse entendre que les MV peuvent être internalisées par macropinocytose ou encore par endocytose clathrine-dépendante. La chlorpromazine a un effet non significatif. Elle est connue pour inhiber l'endocytose clathrine-dépendante mais également pour inhiber la lipase lysosomale. Ainsi, il semblerait que ses deux actions se compensent. En outre, le pourcentage de cellules vertes n'est pas diminué en présence de génistéine ou de filipine, ce qui semble exclure le mécanisme d'endocytose cavéoline-dépendant. Ces résultats semblent aller dans le sens d'une capture des MV par macropinocytose et par endocytose clathrine-dépendante. Concernant les Exo, nous n'observons pas de diminution du pourcentage de cellules vertes en présence d'amiloride ou de cytochalasine B, ce qui suggère que la macropinocytose n'est pas un mécanisme majoritaire. Par ailleurs, la chlorpromazine entraîne ici une augmentation du pourcentage de cellules vertes, ce qui suggère que la balance dégradation / endocytose est en faveur de la dégradation. Ceci est par ailleurs appuyé par l'effet très marqué de la bafilomycine A1. Concernant les cellules CF15, nous ne retrouvons pas les mêmes résultats, ce qui laisse penser que les mécanismes sont différents d'un type cellulaire à un autre. L'effet intéressant de la BafA1 est retrouvé, nous avons choisi de nous intéresser au potentiel de cette drogue pour augmenter l'efficacité des EV (§3.3 p154).

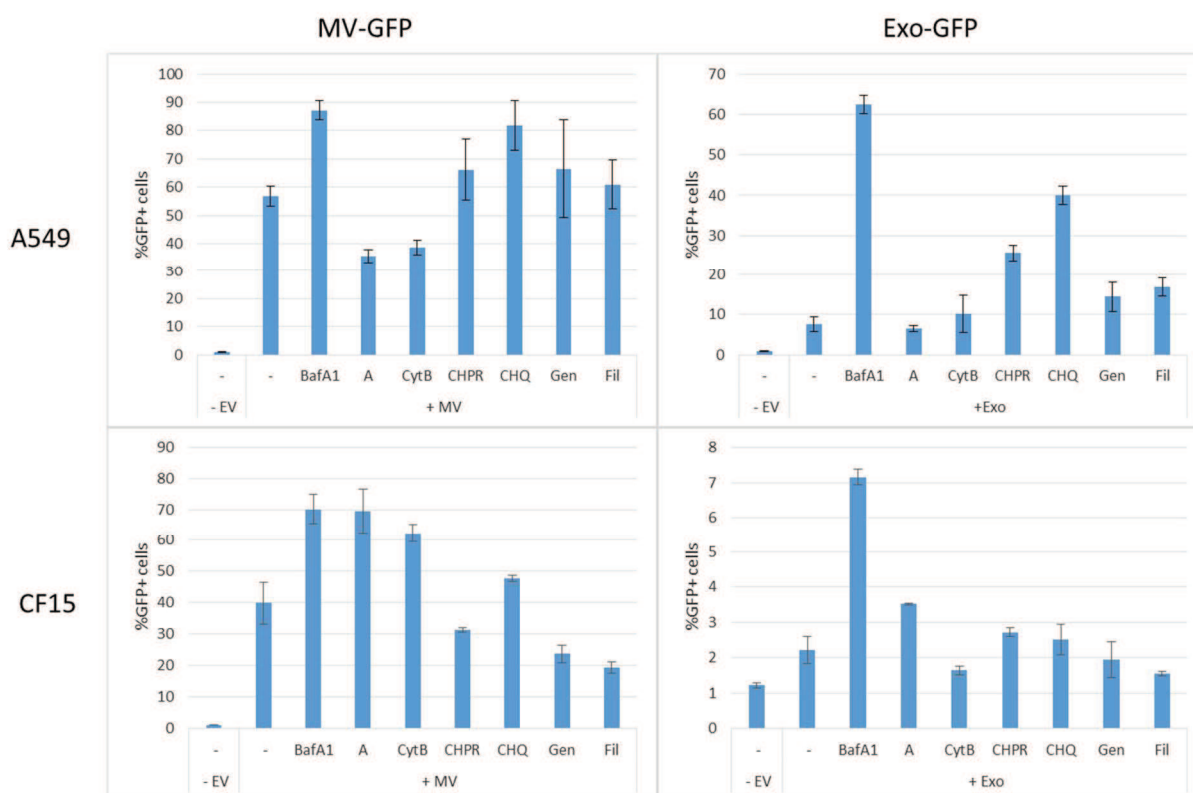


Figure 98. Effet d'inhibiteurs métaboliques sur l'internalisation des EV-GFP dans les A549 et les CF15

3.2.3. Effet de la température

L'effet de la température sur l'internalisation des EV-GFP a été étudié sur les cellules cibles A549 et CF15 (§5.2 p111). Elles ont été mises en présence des EV durant 2h aux températures indiquées puis fixées et analysées par cytométrie en flux. Les résultats montrent que le pourcentage de cellules vertes diminue avec la température (Figure 99). Pour les A549, cette diminution à 22°C est de l'ordre de 25% de la valeur obtenue à 37°C, et à 4°C elle est de près de 50%. En ce qui concerne les CF15, ces chiffres atteignent respectivement 50 et 90%. Par ailleurs, le pourcentage de cellules vertes est trois fois supérieur dans le système homologue que dans le système hétérologue, ce qui confirme les résultats précédemment obtenus (§3.1.2.1.1 p146, 3.1.2.1.2 p147 et 3.2.1 p149). Ces résultats témoignent du fait que l'internalisation des EV est un processus dynamique, température dépendant, qui requière une fluidité optimale de la membrane lipidique, et laisse suggérer qu'il y a également un mécanisme de fusion qui opère, puisque ce dernier est indépendant de l'actine et de l'énergie. Cependant, l'absence d'inhibition totale du signal à 4°C semble indiquer que d'autres processus mettant en jeu des récepteurs membranaires sont impliqués. Ceci confirme la diversité des mécanismes impliqués dans l'internalisation des EV.

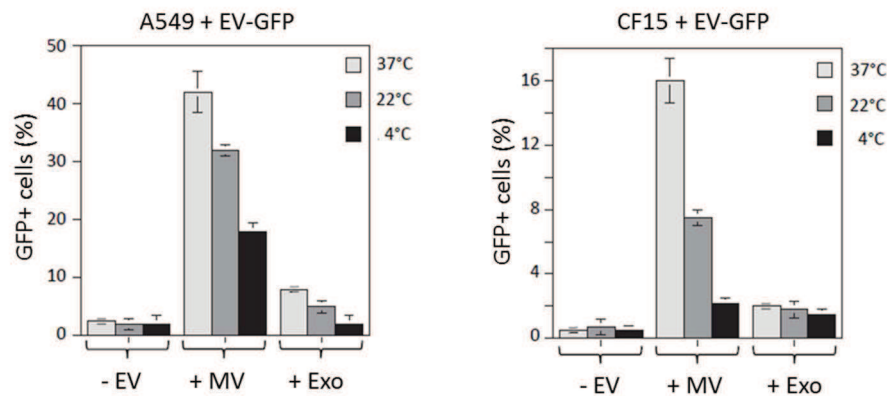


Figure 99. Etude de l'effet de la température sur l'internalisation des EV-GFP dans les cellules A549 et CF15

3.2.4. Imagerie par microscopie électronique à transmission

Des cellules A549 ont été incubées à 37°C durant 2h en présence d'EV-GFP à une dose de 2.10^4 EV/cellule, puis fixées et traitées de manière à les observer en microscopie électronique (§9.3 p118). Les clichés présentés Figure 100 illustrent les résultats précédemment obtenus avec les inhibiteurs métaboliques et l'hypothèse selon laquelle différentes voies peuvent être utilisées par les EV pour être internalisées. Des clichés sont en faveur de la fusion des MV avec la membrane plasmique (Figure 100 a) et b)), d'autres semblent illustrer la macropinocytose (Figure 100 c) et d)). Concernant les Exo, les images évoquent l'endocytose ou encore la macropinocytose (Figure 100 e) et f)).

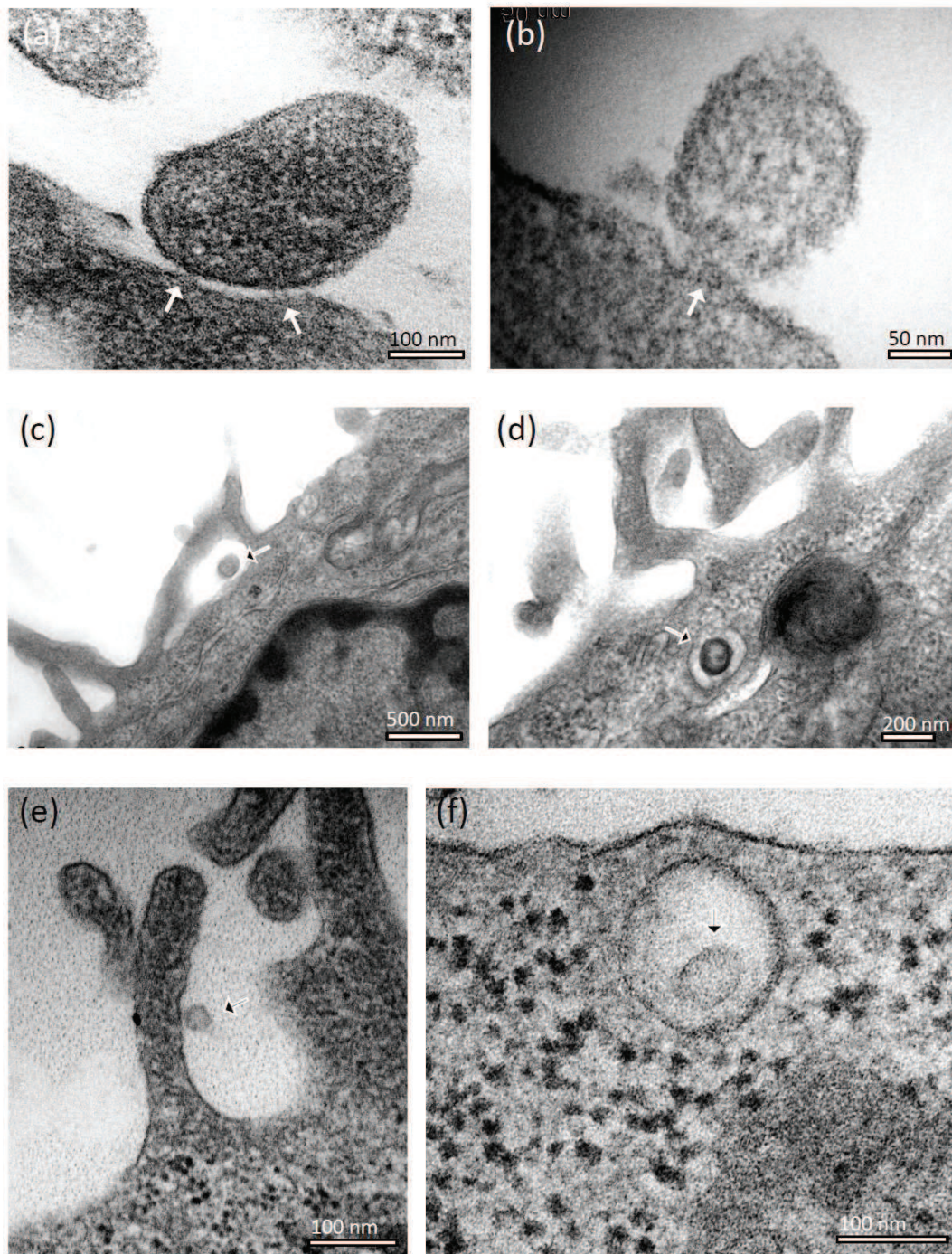


Figure 100. A549 traitées par les EV-GFP et observées en MET
a)-d) MV et e)-f) Exo

3.2.5. Imagerie par microscopie confocale

Nous avons cherché à suivre le trafic intracellulaire des EV en utilisant des anticorps dirigés contre les endosomes précoces, intermédiaires et tardifs, comprenant Rab5, Rab4a, Rab11 ou encore Lamp1. Aucune colocalisation n'a pu être observée, sauf pour les Exo à 24h, où nous observons une colocalisation de la fluorescence de la GFP et de l'anticorps reconnaissant Lamp1 (Figure 101). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle les MV et les Exo ne suivent pas les mêmes voies métaboliques.

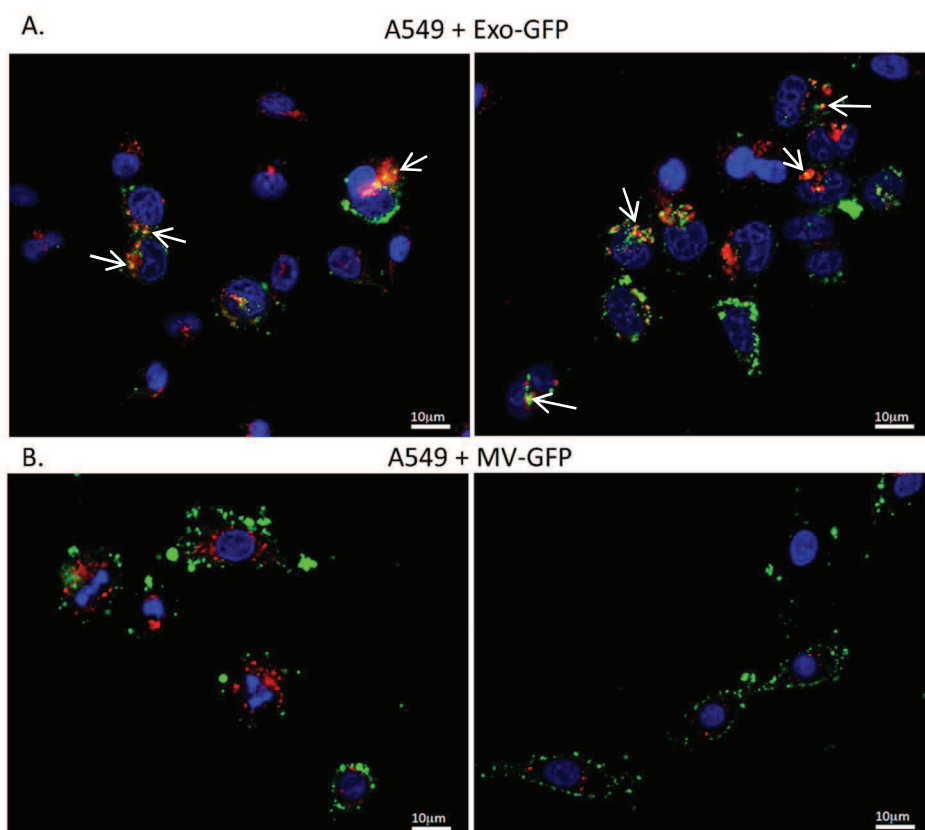


Figure 101. Images de microscopie confocale de cellules A549, cibles des EV-GFP
Les lysosomes sont marqués avec un anticorps anti-Lamp1, révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-Fluor568

3.3. Etude de l'effet de la bafilomycine A1

Comme nous l'avons vu lors de l'étude de l'effet des drogues (§3.2.2 p150), la bafilomycine A1 (BafA1) présente l'intérêt d'augmenter le pourcentage de cellules vertes (Figure 102 B), mais aussi l'intensité de fluorescence des cellules (Figure 102 A). Les cellules cibles A549 traitées par les EV-A549-Ad5-GFP ont été étudiées par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules fluorescentes vertes traitées par les MV passe d'environ 55 % à plus de 85% en présence de BafA1, et par les Exo de près de 10% à plus de 60%. La BafA1 est une drogue qui inhibe de manière spécifique et réversible les ATPases à protons de type vacuolaire (v-ATPases), localisées au niveau des endosomes et des lysosomes. Ces ATPases sont nécessaires à l'établissement de l'environnement acide dans les compartiments de dégradation, de manière à ce que les hydrolases acides puissent dégrader protéines, lipides, acides nucléiques et hydrates de carbone. Ainsi, la BafA1, en inhibant ces v-ATPases, empêche l'acidification des lysosomes et par conséquent la dégradation des molécules présentes dans les lysosomes. Par ailleurs, la BafA1 inhibe également la fusion des endosomes et autophagosomes avec les lysosomes. En présence de la drogue, le pourcentage de cellules fluorescentes vertes est augmenté, ce qui indique que les EV entrent en réalité dans une grande majorité de la population cellulaire mais qu'elles sont en partie dégradées. Il est intéressant d'étudier dans quelle mesure cette drogue pourrait être utilisée pour promouvoir l'efficacité des EV. Cette même expérience a été réalisée à différents temps afin de suivre l'évolution de la fluorescence des cellules (Figure 103). L'effet est visible à partir de 5h pour les MV, et

est conservé à 18h, alors que l'on observe une diminution de la fluorescence des cellules non traitées par la BafA1. Pour les Exo, l'effet est visible dès 2h et est amplifié de manière exponentielle jusqu'à 12h. Il n'est en revanche pas conservé à 18h.

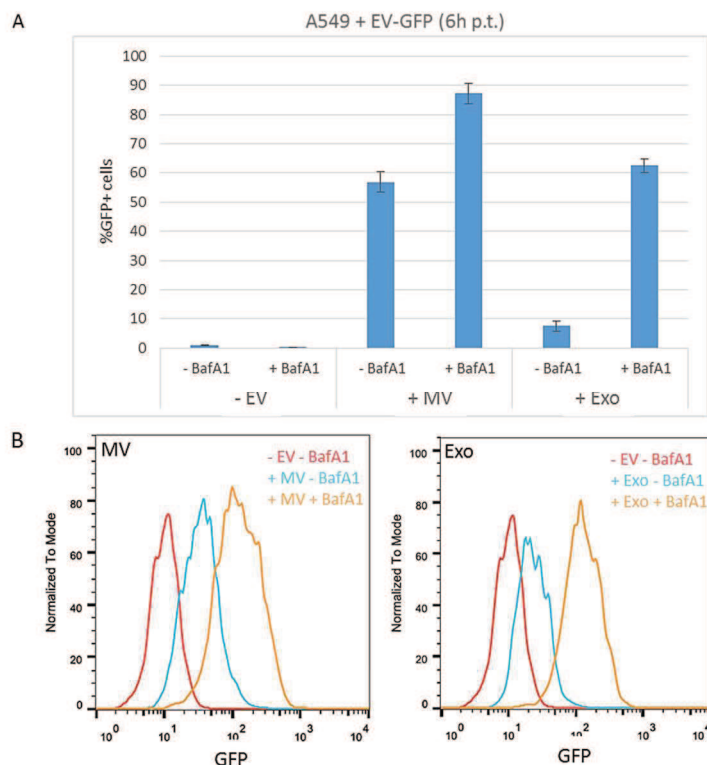


Figure 102. Intensité de fluorescence et pourcentage de cellules A549 GFP+, cibles des EV-GFP, à T+6h

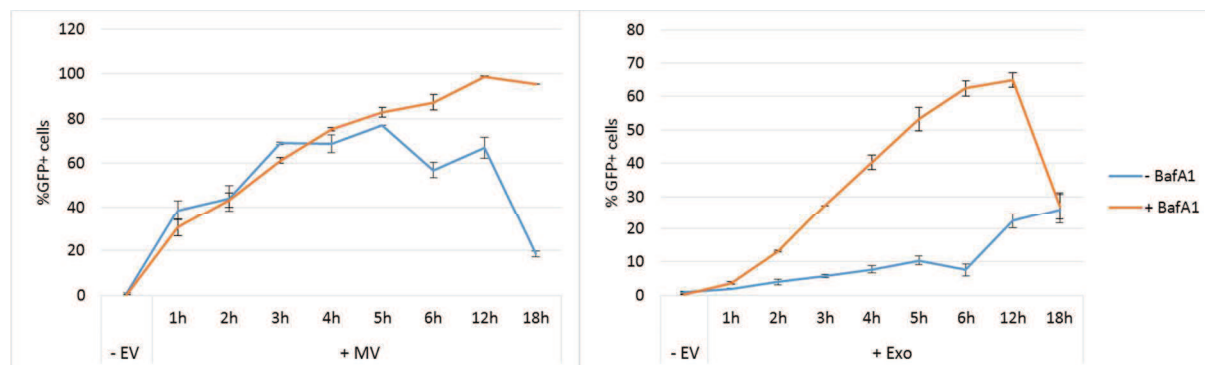


Figure 103. Cinétique d'apparition du signal GFP dans les cellules A549 traitées par les EV-A549-Ad5-GFP en présence ou non de BafA1 (cytométrie en flux)

La cytométrie en flux a par la suite été couplée à la microscopie grâce à la technique d'ImageStreamX afin de visualiser les cellules et leur contenu. Cette expérience a été réalisée avec les EV produites par les A549-Ad5-GFP-CFTR, à 6h post-transduction. Les images obtenues sont présentées Figure 104. Les points verts observés dans les cellules témoignent de la présence du signal à l'intérieur des cellules et confirment la capacité des EV à entrer dans les cellules. Ils semblent néanmoins indiquer que les protéines GFP-CFTR sont piégées dans des compartiments intracellulaires et que leur contenu n'est

pas délivré à la membrane plasmique des cellules. Nous avons cherché à identifier ces points verts et pour cela, nous avons utilisé des baculovirus exprimant des protéines de différents compartiments cellulaires fusionnées à la RFP. Les cellules cibles ont été transduites par ces baculovirus avant d'être mises au contact des EV. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des cellules à la fois vertes et rouges, traduisant le fait que les cellules peuvent difficilement être transduites de deux manières successives.

Une question subsiste : quel est le devenir du contenu des compartiments ? Est-il destiné à être dégradé ou bien peut-il être libéré dans le cytoplasme et permettre à la protéine de rejoindre la membrane plasmique ? Un test de fonctionnalité de la protéine CFTR présente dans les cellules traitées par les MV + BafA1 a finalement été réalisé à T+24h. Malheureusement, il n'a pas permis de mettre en évidence une fonctionnalité accrue de la protéine, confirmant que ces protéines ne sont pas disponibles pour la cellule. Les tests n'ont pas pu être poursuivis dans le temps puisque l'inhibiteur s'est révélé très toxique pour les cellules à des temps plus tardifs. De ce fait, la BafA1 ne peut être utilisée pour améliorer l'efficacité des EV. Cette étude a néanmoins permis de mettre en lumière le fait que la cellule incorpore les EV en grande quantité mais qu'une partie reste piégée dans les compartiments intracellulaires avant d'être dégradée empêchant leur contenu d'être délivré dans le cytoplasme. Il serait intéressant d'étudier ce processus de dégradation, afin de proposer des solutions pour le contourner. Nous pourrions également essayer d'enrichir les vésicules, de manière à diminuer la dose et potentiellement de limiter leur dégradation.

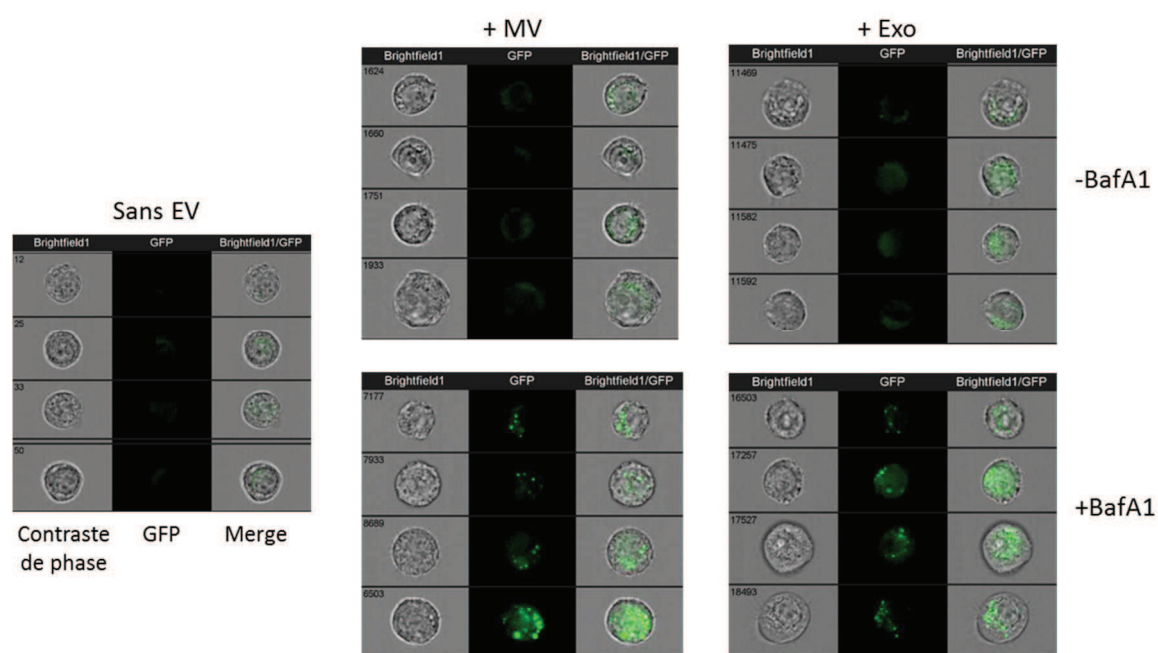


Figure 104. Images ISX des cellules CF15 traitées par les EV A549-Ad5-GFP-CFTR en présence ou non de BafA1

3.4. Transfert d'un type cellulaire à un autre

Sur un plan plus fondamental, nous nous sommes demandé si des EV produites par des cellules épithéliales étaient en mesure de transférer de l'information à d'autres types cellulaires tels que les

neutrophiles, qui présentent un défaut de fonction chez les patients atteints de mucoviscidose (§2.4.6.3 p54).

Mon stage Explora'Doc m'a permis d'aborder ce sujet avec le Pr Marc Chanson et de faire quelques expériences préliminaires qui pourront être approfondies par la suite. L'hypothèse de travail est la suivante : y a-t-il un transfert de CFTR des cellules épithéliales respiratoires aux neutrophiles ? La réponse à cette question pourrait apporter de nouveaux éléments de réflexion quant au mécanisme de défaillance des neutrophiles chez les patients atteints de mucoviscidose et laisse penser que les EV pourraient à la fois traiter les cellules épithéliales respiratoires, mais également les neutrophiles.

Afin d'étudier cette question, nous avons utilisé une autre approche : la coculture de cellules. L'expérience consiste à mettre en présence des neutrophiles en suspension, préalablement marqués à l'aide d'un colorant violet, avec un tapis cellulaire de cellules épithéliales pulmonaires A549, préalablement infectées par l'Ad5-GFP-CFTR et ainsi marquées intrinsèquement en vert. S'il y a effectivement un transfert de GFP-CFTR par l'intermédiaire des EV, on s'attend à avoir des cellules fluorescentes vertes et violettes. Le colorant Draq7 nous permet ici d'éliminer de l'analyse les cellules mortes. Les résultats montrent qu'une population est effectivement caractérisée par les deux marqueurs fluorescents, vert et violet, signifiant que les neutrophiles correspondants ont incorporé des EV (Figure 105). Cet événement semble être plutôt rare puisqu'il concerne 0,28% de la population. Il mériterait cependant d'être exploité. Il serait intéressant d'étudier la fonctionnalité des neutrophiles correspondants en comparant deux populations : CFTRwt et CFTRd^{ΔF508} après les avoir triées par FACS. Ces expériences n'ont pu être réalisées faute de temps mais il était intéressant de le mentionner dans ce manuscrit de thèse.

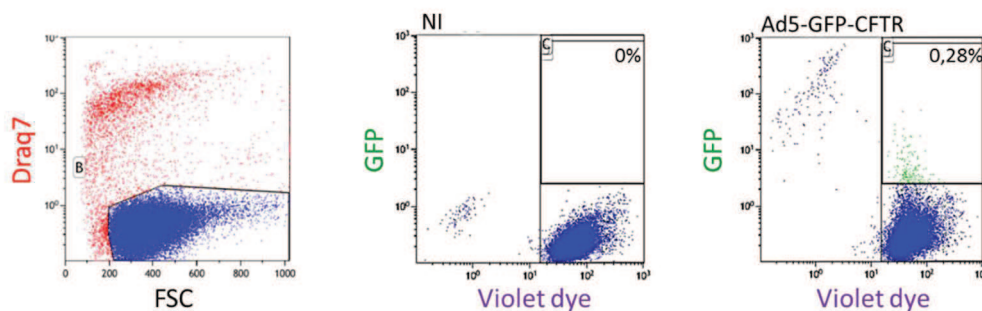


Figure 105. Cytométrie en flux de neutrophiles marqués en violet et issus d'une coculture avec des A549-Ad5-GFP-CFTR

Transfer of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Human Cystic Fibrosis Cells Mediated by Extracellular Vesicles

Cyrielle Vituret,^{1,2} Kathy Gallay,¹ Marie-Pierre Confort,¹ Najate Ftaich,¹ Constantin I. Matei,³ Fabienne Archer,¹ Corinne Ronfort,¹ Jean-François Mornex,¹ Marc Chanson,⁴ Attilio Di Pietro,² Pierre Boulanger,¹ and Saw See Hong^{1,5,*}

¹Viral Infections & Comparative Pathology, UMR-754 UCBL-INRA-EPHE, Université Lyon 1, Lyon Cedex 07, France; ²Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Unité BMSSI, UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1, Lyon Cedex 07, France; ³Centre Technologique des Microstructures, Université Claude Bernard—Lyon, Villeurbanne, France; ⁴Département de Physiologie Cellulaire & Métabolisme, Centre Médical Universitaire, Geneva, Switzerland; ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France.

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, resulting in a deficiency in chloride channel activity. In this study, extracellular vesicles (EVs), microvesicles, and exosomes were used as vehicles to deliver exogenous CFTR glycoprotein and its encoding mRNA (mRNA^{GFP-CFTR}) to CF cells to correct the CFTR chloride channel function. We isolated microvesicles and exosomes from the culture medium of CFTR-positive Calu-3 cells, or from A549 cells transduced with an adenoviral vector overexpressing a GFP-tagged CFTR (GFP-CFTR). Both microvesicles and exosomes had the capacity to package and deliver the GFP-CFTR glycoprotein and mRNA^{GFP-CFTR} to target cells in a dose-dependent manner. Homologous versus heterologous EV-to-cell transfer was studied, and it appeared that the cellular uptake of EVs was significantly more efficient in homologous transfer. The incubation of CF15 cells, a nasal epithelial cell line homozygous for the $\Delta F508$ CFTR mutation, with microvesicles or exosomes loaded with GFP-CFTR resulted in the correction of the CFTR function in CF cells in a dose-dependent manner. A time-course analysis of EV-transduced CF cells suggested that CFTR transferred as mature glycoprotein was responsible for the CFTR-associated channel activity detected at early times posttransduction, whereas GFP-CFTR translated from exogenous mRNA^{GFP-CFTR} was responsible for the CFTR function at later times. Collectively, this study showed the potential application of microvesicles and exosomes as vectors for CFTR transfer and functional correction of the genetic defect in human CF cells.

INTRODUCTION

MOST EUKARYOTIC CELLS naturally release into the extracellular environment a heterogeneous population of membrane-enveloped microparticles, referred to as extracellular vesicles (EVs).¹ These EVs are classified as microvesicles (MVs) and exosomes (EXOs), based on their size, ultrastructural and biochemical properties, and their mode of release. MVs are relatively large (100–1000 nm), nonhomogeneous vesicles, generated by the outward budding and shedding from the cell plasma membrane.^{2,3} They are sometimes referred to as ectosomes or shedding MVs.^{4,5} EXOs represent a more homogenous population of smaller membrane-coated particles (30–100 nm in diameter), gener-

ated by the inward budding of endosomal membranes within large multivesicular bodies (MVBs). The fusion of the MVBs with the cell plasma membrane results in the release of the EXOs into the extracellular milieu.^{2–7}

EVs participate in normal biological processes such as tissue repair,^{8,9} immune surveillance,¹⁰ blood coagulation,¹¹ and stem cell maintenance,¹² by delivering effectors such as transcription factors, small and large noncoding regulatory RNAs, as well as mRNAs. They act as mediators of intercellular communications via the transfer of proteins, lipids, and nucleic acids.^{3,6,10} They are also associated to several diseases such as tumorigenesis,^{13,14} Alzheimer's and Parkinson's diseases,^{15,16}

*Correspondence: Dr. Saw See Hong, Université Lyon 1 and INRA UMR-754, 50, avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France. E-mail: saw-see.hong@univ-lyon1.fr

the spread of the prion protein PrP^c,^{17,18} the dissemination of HIV-1,¹⁹ or the reactivation of latent HIV-1.²⁰ The EVs have a natural ability to transfer membrane, cytoplasmic, and genetic material to neighboring and distant cells, and thus have been exploited as vehicles for the delivery of therapeutic molecules such as bioactive proteins, lipids, and nucleic acids.⁸ Several protocols of EV-based vaccination and antitumor therapy are already at the preclinical or clinical stage.²¹

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disease caused by mutations in a single gene, the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. The CFTR is a type III membrane glycoprotein, with large intracytoplasmic N- and C-terminal domains and 12 membrane-spanning domains constituting a transmembrane, cAMP-dependent chloride channel.^{22,23} It is present at the apical surface of epithelial cells, and localized in the lipid raft microdomains of the plasma membrane.^{24–26} In a previous study, we showed that MVs and EXOs were able to achieve the transfer of the human CFTR mature glycoprotein and CFTR-encoding mRNA molecules (mRNA^{CFTR}) in a Chinese hamster ovarian (CHO) cell model, resulting in the gain in CFTR chloride channel function by MV- and EXo-recipient cells.²⁷

In the present study, we investigated the feasibility of MV- and EXo-mediated delivery of the exogenous CFTR glycoprotein and CFTR-encoding mRNA molecules to CFTR-deficient cells derived from CF patients (CF cells) to restore the CFTR chloride channel function. We used a GFP-CFTR fusion construct, which has been shown to be biologically active and capable of correcting the transepithelial chloride transport,^{28,29} to track the exogenous CFTR protein in EV-recipient cells. We found that both MVs and EXOs were capable of packaging GFP-tagged CFTR and mRNA^{GFP-CFTR}, and transferred both types of molecules to target CF cells, resulting in the correction of the CFTR defect in CF cells. The CFTR chloride channel activity newly acquired by EV-transduced CF cells was measurable until day 3 after the EV-mediated transfer, and still detectable at day 5. Experimental results suggested that the maintenance of this function was performed by newly synthesized CFTR molecules translated from exogenous mRNA^{GFP-CFTR}. This is, to our knowledge, the first demonstration that EVs can be exploited as therapeutic vectors for a genetic disease.

MATERIALS AND METHODS

Cells

A549 and HEK-293 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Man-

assas, VA). HEK-293 (ATCC CRL-1573) and A549 cells (ATCC CCL-185), adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells, were maintained as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies), penicillin (200 U/ml), and streptomycin (200 µg/ml) at 37°C and 5% CO₂. Calu-3 cells, derived from human bronchial submucosal glands, were obtained from the laboratory of M.J. Welsh.^{30,31} Calu-3 cell monolayers were grown at 37°C and 5% CO₂ in a combined medium made up of $\frac{3}{4}$ DMEM and $\frac{1}{4}$ Ham's F12 (Life Technologies), supplemented with FBS, penicillin, and streptomycin at the same doses as above. CF15 cells, human nasal epithelial cells homozygous for the DeltaF508 CFTR mutation,^{30,32} were obtained from the laboratory of M. Chanson.^{32,33} CF15 were grown as monolayers in collagen I-coated flasks (BioCoat; BD Biosciences) at 37°C and 5% CO₂ in CNT-17 medium (CellNTec), supplemented with penicillin and streptomycin.

Adenoviral vectors

Human adenovirus type 5 (HAdV5)-derived vectors HAdV5-GFP and HAdV5-GFP-CFTR have been described and characterized previously.^{28,29} HAdV5-GFP-CFTR encoded the wild-type allele of the *CFTR* gene, fused to the 3' end of the *GFP* gene. Vector stocks were produced and titrated on HEK-293 cell monolayers, as described previously.^{28,29,34,35}

Isolation of microvesicles and exosomes from extracellular vesicles

EVs were recovered from the culture medium of Calu-3, A549, and A549 transduced by HAdV5-GFP or HAdV5-GFP-CFTR, using a previously published protocol.²⁷ In brief, cells grown to 80–90% confluency in T150 flasks (5×10^7 cells/flask) were rinsed 3 times with phosphate buffered saline (PBS), and fresh culture medium, preclarified by ultracentrifugation at $100,000 \times g$ for 16 hr at 4°C, was added to the cells. The EVs in the culture medium were then recovered at 24, 48, and 72 hr, by two successive steps of ultracentrifugation. The culture medium was first centrifuged for 5 min at $13,000 \times g$ and 4°C to remove the cell debris, before the first ultracentrifugation step at $30,000 \times g$ and 4°C for 2 hr, to obtain the first pellet originally called MP₃₀ (now identified as MVs). The supernatant was then subjected to a second round of ultracentrifugation at $100,000 \times g$ and 4°C for 2 hr, which gave the second pellet called MP₁₀₀ (now identified as EXOs). The MV and EXo pellets were resuspended in 200 µl PBS with gentle mixing, and

stored at 4°C. They were used within 10 days in our experiments of EV-mediated cell transfer assays.

Protein assay

Aliquots of each EV sample were kept for protein estimation using the Bradford Reagent (Sigma-Aldrich Corp.). Triplicates of MV and EXo preparations, usually diluted 1:10 to 1:20 in PBS, were lysed with 0.01% SDS at room temperature for 30 min, and then reacted with the Bradford reagent, according to manufacturer's recommendations. Values were extrapolated from a standard curve of serially diluted bovine serum albumin (BSA) samples.

Titration of microvesicles and exosomes by nanoparticle tracking analysis

The concentrations of MV and EXo preparations were subjected to NTA, using the NanoSight LM10 system (Malvern Instruments Ltd.), equipped with a 405 nm laser and a high-sensitivity digital camera (Scientific CMOS trigger camera). Videos were collected and analyzed using the NTA software (version 2.3), with the minimal expected particle size, minimum track length, and blur setting, all set to automatic. Camera sensitivity and detection threshold were set to maximum (16) to detect small particles. Ambient temperature was recorded manually, ranging from 22°C to 27°C. Each sample was diluted in sterile PBS (Life Technologies) to obtain concentration range between 10^8 and 10^9 EVs/ml, and the number of completed tracks per sample was between 500 and 1500. The screen gain was 6 for EXos and 12 for MVs, with a capture time of 60 sec.

Gel electrophoresis and Western blot analysis

Polyacrylamide gel electrophoresis of SDS-denatured protein samples (SDS-PAGE), and immunoblot analysis have been described in previous studies.^{36–39} Briefly, samples were denatured in SDS/beta-mercaptoethanol-containing loading buffer at 100°C for 2 min, and proteins electrophoresed in SDS-denaturing 10% polyacrylamide gel and electrically transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-C-extra; GE Healthcare Life Sciences). Blots were blocked in 5% skimmed milk in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween-20 (TBS-T), rinsed in TBS-T, and then successively incubated with primary antibody and peroxidase-labeled secondary antibodies. Blots were reacted with SuperSignal West Pico chemiluminescence substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.), and exposed to autoradiographic film (Hyperfilm MP; GE Healthcare Bio-Sciences). The apparent molecular

weights of proteins were estimated by comparison with prestained protein markers (Precision Plus Protein Standards, Dual Color; Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Antibodies and reagents

Mouse monoclonal antibody against the human CFTR C-terminus (mouse IgG2A; Clone 24-1; MAB25031) was from R&D Systems. Goat polyclonal anti-CD63 antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Catalog No. SC-15363). Mouse monoclonal anti-GFP antibody (mixture of clones 7.1 and 13.1) was from Roche Applied Science. Peroxidase-coupled monoclonal anti- β -actin antibody was purchased from Sigma-Aldrich (Catalog No. A3854). Peroxidase-labeled rabbit anti-goat IgG antibody (Catalog No. A5420) and sheep anti-mouse IgG antibody (Catalog No. A5906) were also purchased from Sigma-Aldrich.

Metabolic inhibitors of endocytic pathways included two inhibitors of the clathrin-dependent endocytosis, chlorpromazine and the lysosomotropic agent chloroquine; NH₄Cl, an inhibitor of the acidification of the endosomes; Bafilomycin A1, a proton-pump inhibitor that blocks the vacuolar ATPase and the endosome/lysosome fusion; the isoflavone drug genistein and the polyene macrolide antibiotic filipin III, two inhibitors of the clathrin-independent, caveolin-mediated endocytosis; cytochalasin B (CytB), nocodazole (NDZ), and latrunculin A (LatA), which all disorganize the cell cytoskeleton, and have individual preferential negative impacts on endocytosis (CytB), intracytoplasmic trafficking (NDZ), and macropinocytosis (LatA); and the proteasome inhibitor MG132. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich and prepared according to the manufacturer's instructions. They were used under sterile conditions, and at concentrations that did not decrease the cell viability to levels lower than 75%, as determined by the MTT assay (not shown). For testing the inhibitor effects, cell monolayers, taken at 80% confluence, were pretreated with each drug for 1 hr at 37°C before MVs^{GFP} or EXos^{GFP} addition. After a 6 hr incubation at 37°C with EVs (2×10^4 EVs/cell) in the presence of the drug, the cells were collected, fixed, and analyzed by flow cytometry.

EV-mediated transfer of GFP and GFP-CFTR into target cells

In a typical experiment, samples of GFP-loaded EVs (MV^{GFP} and EX^{GFP}) and GFP-CFTR-loaded EVs (MV^{GFP-CFTR} and EX^{GFP-CFTR}) in PBS were mixed with an equal volume of prewarmed serum-free medium, and 50–100 μ l aliquots added to A549

or CF15 cell monolayers (2×10^5 cells/well). The total input (50–100 μ l) contained 5–50 μ g protein and 2×10^9 to 10×10^9 EVs, with transducing doses ranging from 5×10^3 to 5×10^4 EVs/cell. The cells were further incubated at 37°C, and the GFP signal was monitored in live cells using a Zeiss Axiovert-135 inverted microscope equipped with an AxioCam digital camera. Cells were harvested at different time periods, and GFP-positive or GFP-CFTR-positive cells were quantitated using flow cytometry. CFTR-associated chloride channel activity was measured using an iodide-selective microelectrode, as described below.

DNA and RNA isolation, and PCR analyses

DNA from cells and EVs was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Total RNA was extracted from cells using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel), and from EVs using the QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen). Aliquots (100 ng) of RNA were reverse transcribed using the Iscript DNA synthesis kit (BioRad). Real-time PCR (RT-PCR) was performed using the KAPA Sybr Fast qPCR kit (KAPA Biosystems) and the StepOnePlus apparatus (ThermoFisher). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of RNA was performed using the protocol described in ref.⁴⁰ and the ribosomal protein RPL27 RNA transcript as internal standard, amplified with the following primers: sense 5'-ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA-3'; antisense 5'-TCTGAAGACATCCTTAT TGACG-3'. For the *CFTR* gene, a PCR-amplified fragment of 415 nucleotides (nt) in length, overlapping exons 3 and 5 of the *CFTR* gene, was obtained with the following primers⁴¹: sense 5'-AGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTC-3' (exon 3); antisense 5'-TTCATCAAATTTGTTTCAGGTTGT TG 3' (exon 5). In the case of the *GFP-CFTR* fusion, a fragment of 196 nt in length, overlapping the GFP and CFTR junction sequence,^{28,29} was obtained using a forward primer designed from the 3' end of the *GFP* gene (nucleotide position 621; 5'-AACGAGAAGCGCGATCACATG), and an antisense primer designed from the 5' end of the *CFTR* gene (nucleotide position 78 in the *CFTR* gene; 5'-GCGCTGTCTGTATCCTTTCTCTCAA). For the *GFP* gene, a fragment of 99 nt within the *GFP* gene was obtained using the following primers: sense 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'; antisense 5'-CTCGCCGACACGCTGAAC-3'. For the *HAdV5* hexon gene, a fragment of 465 nt was obtained using the following primers: forward 5'-GCTGTATT TGCCCGAC-3'; reverse 5'-CATGGCCTCAAGCG TG-3', corresponding to the genome nt 20,276–20,291 and 20,726–20,741, respectively.

Iodide efflux assay

The iodide efflux assay, which reflected the activity of the CFTR channel, was measured using an iodide-selective microelectrode.⁴² The experimental setup included the MicroIodide Ion Electrode (LIS-146ICM; Lazar Research Laboratories), connected to an ORP-meter (ORP Model 62; Jenco Instruments Inc.), and the protocol described by Aleksandrov et al.⁴³ Replicates of cell monolayers were loaded with sodium iodide by incubation for 30 min at 37°C in prewarmed iodide-loading buffer (ILB: 136 mM NaI, 3 mM KNO₃, 2 mM Ca[NO₃]₂, 11 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4 with NaOH). Cells were then washed 10 times with efflux buffer (EB; 136 mM NaNO₃, 3 mM KNO₃, 2 mM Ca[NO₃]₂, 11 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4 with NaOH) to completely remove extracellular iodide. The CFTR stimulation mixture (10 μ M forskolin, 100 μ M dibutyryl-cAMP, 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX] as enhancer of intracellular cAMP) was added at time 0, to activate efflux through CFTR channels. The values of the voltage generated by iodide in solution were extrapolated from the standard curve generated by measuring the voltages of standard NaI solutions. Iodide efflux values, expressed in nmol/min, represented the mean \pm SEM of the amount of iodide released from the cells during each 1 min interval ($n=3$). At the end of each assay, efflux buffer containing 0.1% NP-40 was added to release the whole bulk of intracellular iodide.

Flow cytometry

Cells were seeded in complete media in 24- or 48-well plates to obtain a confluency of 70–80% the following day. The cells were then incubated with MVs or EXos at 37°C and further incubated for different lengths of time. At the end of the incubation periods, the cells were rinsed with PBS, and detached with PBS containing 0.05% trypsin and 1 mM Na₂EDTA. After centrifugation, the cells were fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde, and analyzed in an LSRII flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences).

Cell imaging

Fluorescence microscopy. Cell monolayers were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS. Cells were then blocked in 1% BSA in PBS for 1 hr at room temperature and incubated with primary monoclonal antibodies against Rab5 (clone C8B1; Cell Signalling), Rab4a (D-20; Santa Cruz Biotech), Rab11 (clone H-87; Santa Cruz Biotech), and Lamp1 (or CD107a; BD Biosciences), following dilutions

recommended by the manufacturer. Samples were then rinsed in PBS and incubated with Alexa Fluor 568-conjugated goat antimouse IgG antibody, diluted 1:1000 (Molecular Probes, Invitrogen) for 1 hr at room temperature, rinsed, and treated with DAPI before being mounted on slides. Observations were performed using an Axioimager Z1 epifluorescence microscope (Carl Zeiss France) and a confocal microscope (LSM710; Carl Zeiss). Images were analyzed using the Zen software (Carl Zeiss).

Electron microscopy. For negative staining of MVs and EXOs, samples were adsorbed on gold grids, and negatively stained with 2% uranyl acetate before EM observation.⁴⁴ For ultrathin sections, cell samples incubated with MVs or EXOs were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4, pelleted, and postfixed with osmium tetroxide (1% in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4). The specimens were dehydrated and embedded in Epon resin, sectioned, and processed as previously described.^{27,38} Ultrathin sections were examined under a JEM-1400 Jeol electron microscope equipped with an Orius-Gatan digital camera (Gatan France, 78113 Grandchamp).

Statistics

Results were expressed as mean \pm SEM of n observations. Comparison between two samples was performed using the Student's t test (Excel); multiple samples were compared using the one-way ANOVA test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Isolation, characterization, and nomenclature of EVs recovered from human cells

Human epithelial cell lines Calu-3 (human bronchial submucosal glandular cells) and A549 (human adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells) were tested as EV-producing cells. Calu-3 cells are considered as a pertinent *in vitro* model of respiratory functions and chloride channel activity.⁴⁵ On the other hand, A549 cells are permissive to human adenovirus serotype 5 (HAdV5), and to the adenoviral vectors HAdV5-GFP or HAdV5-GFP-CFTR, which express the green fluorescent protein (GFP) or GFP-CFTR, a GFP-fused version of the human CFTR glycoprotein.^{28,29} EVs that are naturally released in the culture supernatant of A549 and Calu-3 cells were separated into two populations, using a two-step ultracentrifugation procedure. The first fraction, MP₃₀, was recovered in the pellet after centrifugation at 30,000 $\times g$, and the

second fraction, MP₁₀₀, was pelleted after a second round of centrifugation at 100,000 $\times g$. The two EV populations could be distinguished by their morphology under the EM, their size, and protein surface markers.

As exemplified by EV samples from A549 cells, MP₃₀ consisted of large particles characterized by their size heterogeneity, ranging from 200 to 1200 nm in diameter (Fig. 1a, left panel). The MP₁₀₀ population, however, showed more homogeneous regular particles, rather spherical and relatively small in size, ranging from 15 to 60 nm (Fig. 1a, right panel). Size measurements were performed using dynamic light scattering (DLS), and representative DLS patterns obtained with EVs from Calu-3 cells are shown in Fig. 1b. A similar range of values as those estimated by EM was found for both types of EVs: 100–1000 nm for the diameter of MP₃₀ (320 ± 280 nm; mean \pm SEM; $n = 2,272$ k counts/s), and 20–200 nm (65 ± 24 nm; $n = 1,770$ k counts/s) for MP₁₀₀ (Fig. 1b, compare the left and right panels).

MP₃₀ and MP₁₀₀ issued from Calu-3 cells were also analyzed with respect to their CD63 content, a specific marker of the exosomal compartment.⁴⁶ Only the MP₁₀₀ fraction, and not MP₃₀, was found to contain CD63 (Fig. 1c, left panel), indicating that MP₁₀₀ fraction was essentially composed of exosomes, whereas the MP₃₀ fraction contained a majority of MVs. Thus, for the rest of this study, the terminology of microvesicles (abbreviated MVs) and exosomes (abbreviated EXOs) was used instead of MP₃₀ and MP₁₀₀, respectively. The term “extracellular vesicles” (EVs) included both MVs and EXo populations.

Production and recovery of extracellular EVs

Culture supernatants of Calu-3 or A549 cells were collected three times over a period of 72 hr, successively at 24, 48, and 72 hr. After pooling the three samples, the recovery of MVs and EXOs was assayed by nanoparticle tracking analysis (NTA). From 2.5×10^8 EV-producing cells, we obtained $4.92 \pm 0.96 \times 10^{10}$ MVs and $10.8 \pm 2.1 \times 10^{10}$ EXOs with A549, and $4.46 \pm 0.59 \times 10^{10}$ MVs (mean \pm SEM; $n = 6$) and $8.20 \pm 1.35 \times 10^{10}$ EXOs with Calu-3 cells. The yields did not significantly differ for the two types of EV-donor cells, which corresponded to about 200 MVs per cell and 300–400 EXOs per cell, over a 72 hr period culture. After resuspension in 200 μ l PBS, the EV titer was $\sim 2.5 \times 10^8/\mu$ l for MVs, and $5 \times 10^8/\mu$ l for EXOs. The protein concentrations ranged between 0.25 and 0.5 μ g/ μ l, that is, a ratio of 2×10^8 MVs or EXOs per μ g protein. This ratio was consistent with the values reported in the litera-

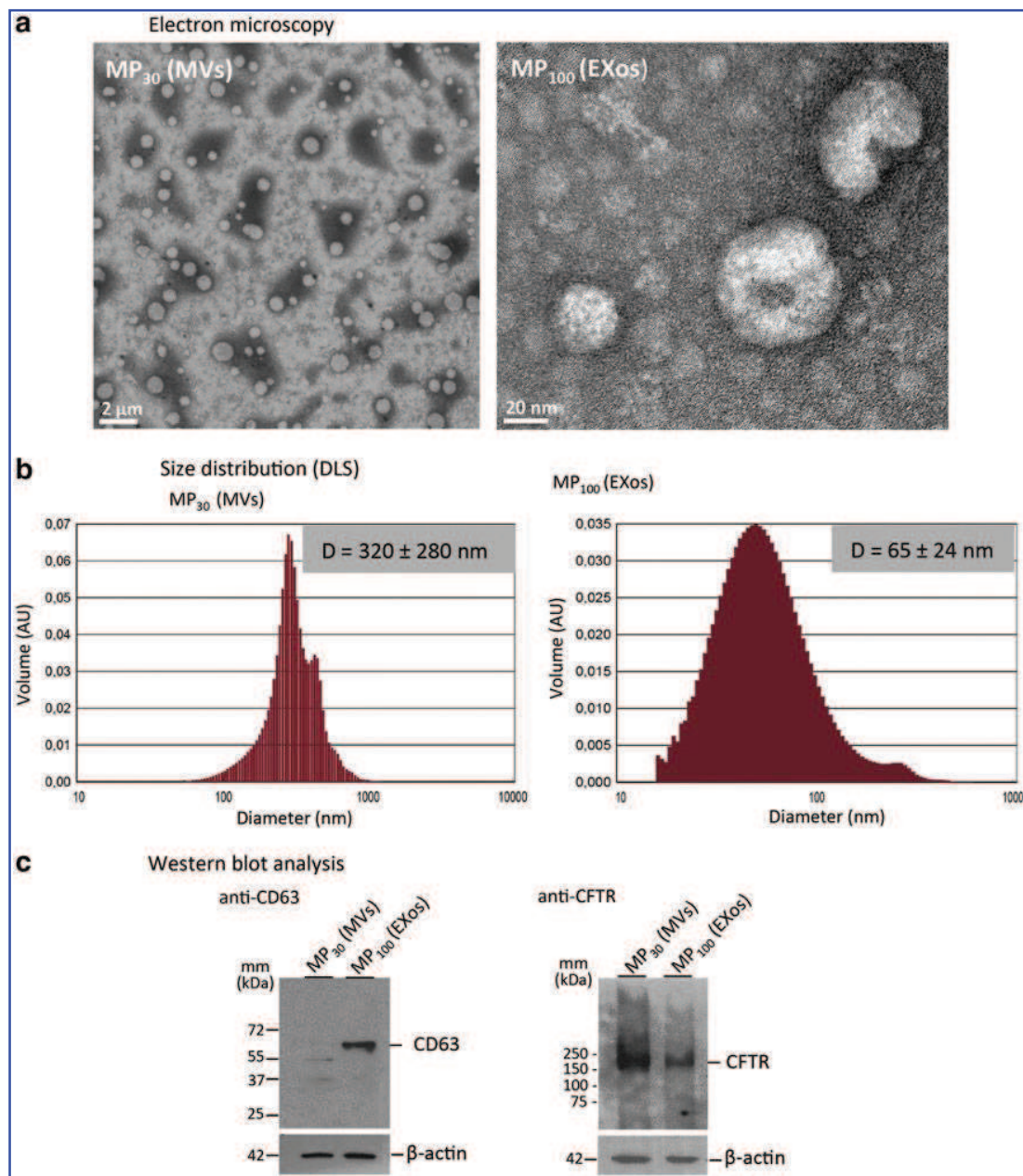


Figure 1. Morphological, biophysical, and biochemical characterization of extracellular vesicles (EVs) isolated from human cells. **(a)** Electron microscopy (EM). MP₃₀ pellet (microvesicles [MVs], *left panel*) and MP₁₀₀ pellet (exosomes [EXOs], *right panel*) were isolated from A549 cell culture medium by differential ultracentrifugation at $30,000 \times g$ and $100,000 \times g$, respectively, and negatively stained for observation under the EM. **(b)** Diffusion light scattering (DLS). Populations of MP₃₀ (MVs, *left panel*) and MP₁₀₀ (EXOs, *right panel*) isolated from Calu-3 cell culture medium were analyzed by DLS. **(c)** Protein content. MP₃₀ and MP₁₀₀ pellets isolated from Calu-3 cells were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting, using anti-CD63 antibody (*left panel*), or anti-CFTR antibody (*right panel*); β -actin (42 kDa) was used as internal control of protein loads. Lane mm, protein markers, with their molecular masses indicated in kDa. CFTR, CF transmembrane conductance regulator. Color images available online at www.liebertpub.com/hum

ture for exosomes preparations obtained by ultracentrifugation and titrated by NTA (6×10^8 EXOs/ μ g; see ref.⁴⁷).

EV-mediated delivery of chloride channel activity to human CF cells

In an earlier study, we generated a CHO cell line that stably expressed the GFP-CFTR protein and

released MVs and EXOs containing the GFP-CFTR glycoprotein and GFP-CFTR-encoding mRNA (mRNA^{GFP-CFTR}). We showed that both types of molecules were transferable to target CHO cells.²⁷ Because Calu-3 cells are known to naturally express CFTR at relatively high levels,⁴⁵ we assumed that MVs and EXOs isolated from Calu-3 would contain high amounts of CFTR and mRNA^{CFTR}.

This was confirmed by SDS-PAGE and Western blot analysis, which showed that CFTR glycoprotein was detectable in both MVs and EXOs, but in higher amounts in MVs compared with EXOs (Fig. 1c, right panel). RT-PCR performed on MV and EXo samples normalized to the same EV titer showed that both types of EVs contained mRNA^{CFTR}, but MVs had an apparent higher mRNA^{CFTR} content, compared with EXOs (Fig. 2a).

We next determined whether MVs and/or EXOs isolated from the Calu-3 cell culture medium (referred to as [Calu-3]MV and [Calu-3]EXOs) were capable of conferring the CFTR-associated chloride channel function to CF15 cells, a human nasal epithelial cells homozygous for the $\Delta F508$ CF mutation.^{30,32,33} CF15 cells were incubated for 6 hr at 37°C with [Calu-3]MV or [Calu-3]EXOs at the transducing dose of 200 EVs/cell. Fresh culture medium was then added, and cells were further incubated for 72 hr at 37°C. At the end of this period, the medium was removed, and the cells were tested for the cAMP-dependent CFTR chloride channel activity, measured by the iodide efflux assay using an iodide-selective microelectrode.^{42,43}

Curves representative of the cyclic cAMP-stimulated iodide efflux response in EV-transduced CF15 cells were compared with the curves of untreated CF15 cells (negative control), and of Calu-3 cells (positive control). A peak of CFTR channel activity was detected in EV-treated CF15 cells, suggesting the restoration of the CFTR function in these target cells (Fig. 2b). The CFTR chloride channel activity measured in EXo-treated CF15 cells was slightly lower, compared with that of MV-treated CF15 cells (Fig. 2b, c). Interestingly, the peak of channel activity was obtained at 4 min in EV-treated CF15 cells, a slight delay compared with the peak of Calu-3 that occurred at 2–3 min (Fig. 2b, c). Even though the levels of CFTR channel activity observed in EV-treated CF15 cells were 10- to 20-fold lower than that of the Calu-3 cells, this positive result incited us to pursue our studies, in an attempt to improve the efficiency of the CFTR transfer in human cells. The factors that could influence the transfer of the CFTR function included the nature of the EV-donor and EV-recipient cells, the EV cargo and the EV doses, and the experimental conditions of EV-cell interaction. These different parameters were investigated in the following experiments.

Characterization of EV-donor cells

Fluorescent EVs loaded with GFP or GFP-tagged CFTR were used to help us track and quantitate the uptake of EVs by target cells.²⁷ We

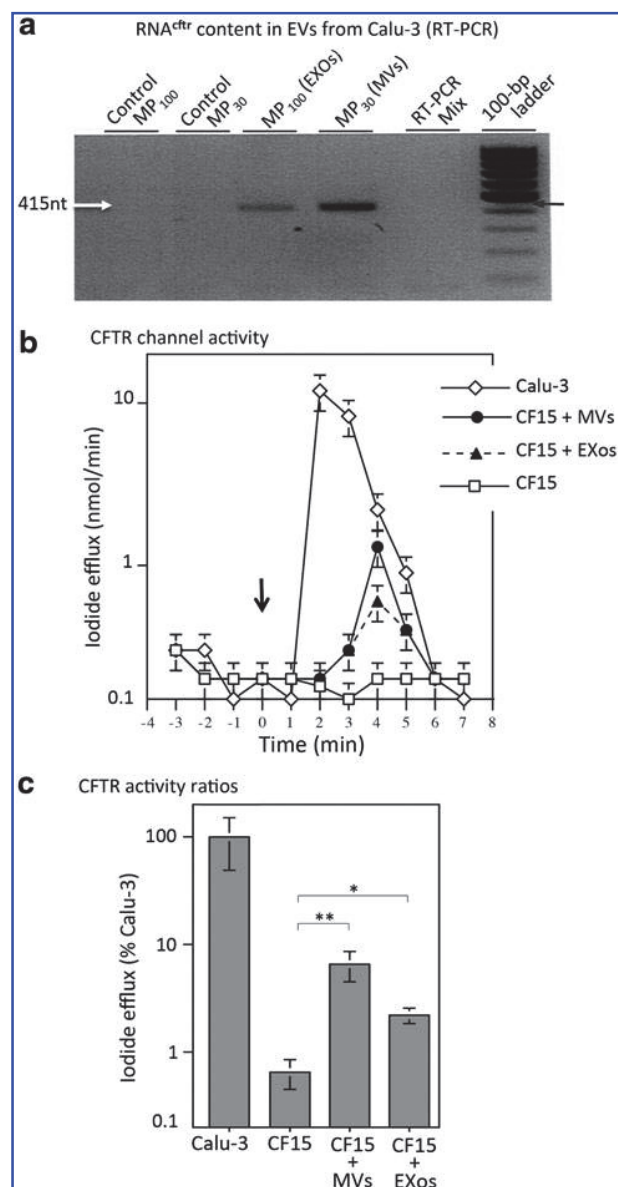


Figure 2. Characterization of Calu-3 as EV-donor cells. **(a)** RNA^{CFTR} content of EVs. MP₃₀ (MVs) and MP₁₀₀ (EXOs) isolated from Calu-3 cell culture medium were analyzed by RT-PCR, using CFTR-specific primers. Control MP₁₀₀ and control MP₃₀ corresponded to the fractions recovered by ultracentrifugation at 100,000 × *g* and 30,000 × *g*, respectively, from medium that had not been in contact with any cells. Control MP₁₀₀ and MP₃₀ were subjected to the same RT-PCR as MP₁₀₀ and MP₃₀ isolated from Calu-3 cell culture media. The 415-nucleotide (nt) fragment amplified from the CFTR mRNA is indicated by arrows. **(b)** CFTR chloride channel activity in Calu-3 (EV-donor cells) and CF15 cells (EV-recipient cells). Aliquots of CF15 cells (1.5×10^6) were incubated with MVs or EXOs isolated from the 72 hr culture medium of Calu-3 (1.5×10^7 cells), at 200 EVs per cell, for 6 hr at 37°C. Control Calu-3 (EV-donor cells), untreated CF15, and MV- or EXo-treated CF15 cells were first loaded with iodide, and cAMP-containing stimulation cocktail was then added at time 0 (arrow) to activate the anion efflux through CFTR channels. The amount of iodide released from the cells was measured at 1 min intervals, using an iodide-selective electrode (mean ± SEM; *n* = 3). Shown are representative curves of the iodide efflux. **(c)** CFTR activity ratios. The CFTR Cl[−] channel activity in Calu-3 and CF15 cells was deduced from experimental curves, as exemplified in **(b)**. The values of CFTR Cl[−] channel activity determined in untreated CF15, and in MV- or EXo-transduced CF15 cells were expressed as the percentage of the mean value obtained with Calu-3 cells, attributed the 100% value. **p* ≤ 0.05; ***p* ≤ 0.005. Note the log scale of the *y* axis.

assumed that EVs isolated from A549 cells transduced by HAdV5 vectors overexpressing either the GFP or GFP-CFTR protein would incorporate relatively higher amounts of GFP or GFP-CFTR glycoproteins and their corresponding mRNAs, compared with EVs from Calu-3 cells. SDS-PAGE and Western blot analysis, using anti-CFTR and anti-GFP antibodies, were performed on A549 cell lysates and compared with Calu-3 cell lysates. As expected, the CFTR glycoprotein content of HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells could be estimated to be 10–30 times higher than the endogenous CFTR content of Calu-3 cells, after normalization to equivalent protein loads (Fig. 3a).

RT-PCR amplified a 415 nt fragment from the endogenous mRNA^{CFTR} present in Calu-3 cells, and the same fragment was amplified from the mRNA^{GFP-CFTR} transcript coding for the GFP-CFTR fusion protein in HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells. No endogenous mRNA^{CFTR} was detectable in control, nontransduced A549 cells, or in CF15 cells (Fig. 3b, left panel). A 99 nt fragment, amplified from the *GFP* gene, and a 196 nt fragment, specific of the *GFP-CFTR* junction, were found only in the RT-PCR samples of

HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells, and not in the other samples (Fig. 3b, right panel). We therefore used HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells as EV-donor cells, and both A549 and CF15 as target cells for homologous and heterologous EV cell transfer, respectively.

Characterization of EVs^{GFP} and EVs^{GFP-CFTR} from A549 cells

MVs and EXOs prepared from control, non-transduced A549 cells and from HAdV5-GFP- or HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells were analyzed for their GFP fluorescent signal by flow cytometry (Fig. 4a). Over 80% MVs and EXOs from HAdV5-GFP-transduced A549 cells carried the GFP fluorescent signal (Fig. 4a). In contrast, the populations of EVs recovered from HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells contained only 10–12% fluorescent MVs, and 2–3% fluorescent EXOs, namely, 4–5-fold less for the latter (Fig. 4a). These results were consistent with the fact that GFP is an abundant cytoplasmic and nuclear protein, whereas GFP-CFTR is a tightly regulated channel protein, localized in specialized microdomains of the cell plasma membrane.^{24–26}

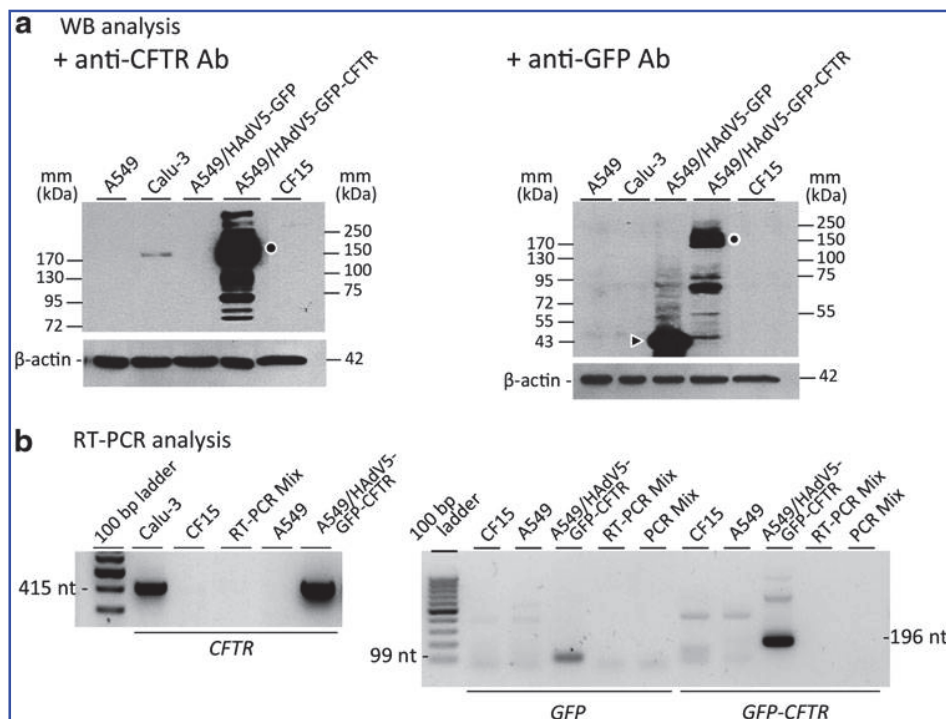


Figure 3. Characterization of EV-donor cells. Calu-3 and A549 cells, as indicated at the top of the panels, were probed for their CFTR or GFP-CFTR glycoprotein contents (a), and corresponding mRNAs (b). (a) SDS-PAGE and Western blot analysis. Whole cell lysates were analyzed using anti-CFTR (left panel), or anti-GFP antibodies (right panel). The CFTR band is indicated by a dot, and free GFP by an arrowhead. (b) RT-PCR analysis. RT-PCR was performed using different pairs of primers, specific to the *CFTR* gene (left panel), or specific to the *GFP* gene and *GFP-CFTR* junction (right panel). The amplified fragments were 415 nt in length for *CFTR*, 99 nt for *GFP*, and 196 nt for the *GFP-CFTR* junction, respectively.

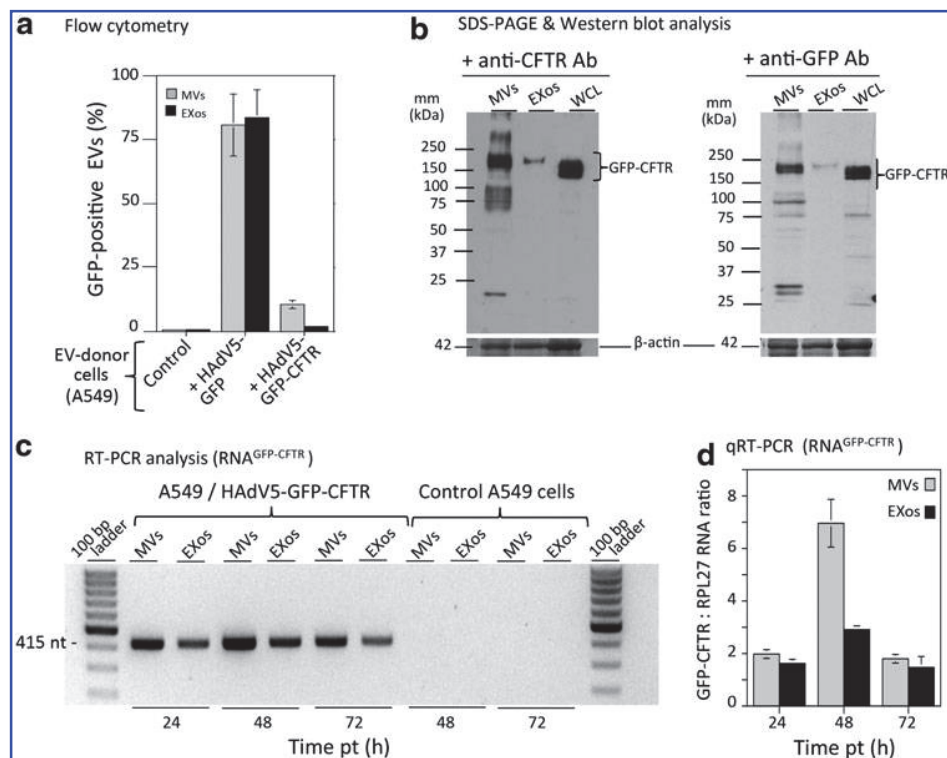


Figure 4. Characterization of EVs isolated from A549 cells. **(a)** Flow cytometry. MVs and EXOs were isolated from the culture medium of untreated A549 cells used as negative controls, A549 cells transduced with HAdV5-GFP, and A549 cells transduced with HAdV5-GFP-CFTR at 72 hr posttransduction (pt). The isolated MVs and EXOs were analyzed for the intensity of the GFP signal by flow cytometry. **(b)** GFP-CFTR glycoprotein content. MVs and EXOs isolated from HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells at 72 hr pt were probed for GFP-CFTR, using SDS-PAGE and Western blot analysis with antibodies (Ab) against CFTR (*left panel*), or GFP (*right panel*). Lane WCL, whole cell lysates were used as positive controls. Lane mm, molecular markers. **(c)** RNA^{GFP-CFTR} content (RT-PCR). MVs and EXOs from untreated A549 or HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells were collected at different times pt, and subjected to RT-PCR analysis, using CFTR-specific primers. **(d)** Quantitative RT-PCR of RNA^{GFP-CFTR}. The qRT-PCR analysis of MVs and EXOs was performed using the pair of primers amplifying the GFP-CFTR junction (196 nt fragment), with RPL27 RNA as the internal standard.

Samples of MVs^{GFP-CFTR} and EXOs^{GFP-CFTR} were then analyzed by SDS-PAGE and Western blotting, using anti-GFP or anti-CFTR antibodies to detect the GFP-CFTR fusion protein (Fig. 4b). The GFP-CFTR protein signal in MVs^{GFP-CFTR} was estimated to be 10–20-fold higher, on a per-EV basis, compared with that of EXOs^{GFP-CFTR} (Fig. 4b). Of note, a single band of the CFTR protein migrating with an apparent molecular mass of 210–220 kDa was visible in the EXOs^{GFP-CFTR} fraction, which was compatible with that of the GFP-fused mature CFTR glycoprotein (25+190 kDa). In the MVs^{GFP-CFTR} samples, however, several bands were detected, including a major doublet band at 200–220 kDa, and extra bands of immature CFTR and/or cleavage products (Fig. 4b).

MVs^{GFP-CFTR} and EXOs^{GFP-CFTR} isolated from the A549 cell culture medium at different times after transduction with HAdV5-GFP-CFTR were then probed for their mRNA^{GFP-CFTR} content. RT-PCR analysis, performed using primers overlapping the GFP-CFTR junction, or primers within

the CFTR gene sequence, suggested that the maximum incorporation of mRNA^{GFP-CFTR} into both MVs and EXOs was attained during the first 48 hr after cell transduction with HAdV5-GFP-CFTR (Fig. 4c). This was confirmed by quantitative RT-PCR, which also showed that the mRNA^{GFP-CFTR} content was twofold higher in MVs^{GFP-CFTR}, compared with EXOs^{GFP-CFTR} (Fig. 4d).

Because MVs^{GFP-CFTR} and EXOs^{GFP-CFTR} were isolated from A549 cells transduced by the HAdV5-GFP-CFTR vector, we determined whether these EVs could also contain adenoviral vector DNA or fragments thereof. Quantitative PCR using primers specific of the GFP-CFTR gene junction was performed on MVs^{GFP-CFTR} and EXOs^{GFP-CFTR} samples harvested at 24 and 48 hr after HAdV5-GFP-CFTR transduction. Vector DNA was found in both types of EVs, and their DNA content increased with time posttransduction. There was no significant difference in vector DNA content between MVs^{GFP-CFTR} and EXOs^{GFP-CFTR} (Supplementary Fig. S1a; Supplementary Data are available online

at www.liebertpub.com/hum). To further characterize the vector DNA incorporated in EVs, MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} were tested by plaque assays on HEK-293 cells, a *trans*-complementing cell line for rescuing E1A+E1B-deleted HAdV5 vectors such as HAdV5-GFP-CFTR. No viral plaques were obtained at any of the EV doses tested, implying that no viable adenoviral vector could be rescued from the EVs (not shown).

Cellular uptake of MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} by target cells

EV dose dependence of the GFP-CFTR transfer. MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} from HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells were added to A549 or CF15 cell monolayers (5×10^5 cells per well) at different transducing doses, ranging from 5×10^3 to 4×10^4 EVs/cell, and incubated for 6 hr at 37°C. The cells were then harvested, and cell-associated fluorescent signal was analyzed by flow cytometry. There was a progressive increase in GFP-positive cells from 5% to 40% with increasing doses of MVs^{GFP-CFTR}. A dose-dependent progressive augmentation of GFP-positive cells was also observed with EXos^{GFP-CFTR}, reaching a maximum of 10% GFP-positive cells at the highest dose tested (Fig. 5a).

Cytotoxicity of MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR}. The potential cytotoxicity of MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} was tested at different doses on A549 and CF15 cells, using MTT assays. The viability of EXos^{GFP-CFTR}-transduced A549 cells decreased to 60% at the highest dose of 4×10^4 EVs/cell, but the other cell samples showed more than 80% viable cells within the range of 2×10^4 to 4×10^4 EVs/cell. Interestingly, the CF15 cells showed the highest degree of tolerance to both MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR}, with no significant cytotoxicity detected at the highest dose of 4×10^4 EVs/cell (Fig. 5b).

Temperature dependence. We next explored the effect of the incubation temperature on the cellular attachment and uptake of EVs in both homologous and heterologous systems. Aliquots of MVs^{GFP} and EXos^{GFP} from HAdV5-GFP-transduced A549 cells were added to A549 or CF15 cell monolayers (2×10^4 EVs per cell), and cells were incubated for 2 hr at 37°C, 22°C, and 4°C, respectively. At the end of this period, cells were collected, fixed, and analyzed by flow cytometry. The uptake of MVs^{GFP} and EXos^{GFP} was temperature dependent for both types of cell targets, with a progressive decrease of the EV-mediated transduction with the

lowering of the incubation temperature (Fig. 5c). In comparison to MVs^{GFP}-transduced A549 cells at 37°C, a reduction of about 25% was observed at 22°C, and 50% at 4°C. In MVs^{GFP}-transduced CF15 cells, the reductions were 50% and 90% at 22°C and 4°C, respectively. Because of the relatively low values at 37°C, the variations with the temperature lowering were less pronounced for the cellular uptake of EXos^{GFP} by both targets (Fig. 5c). In addition, the proportion of transduced cells and the transduction efficiency were significantly higher in the homologous cellular uptake compared with the heterologous uptake at all temperatures tested (Fig. 5c; compare upper and lower pairs of panels). These results suggested that the cellular uptake of A549-issued MVs^{GFP} and EXos^{GFP} by A549 and CF15 cells was a temperature-dependent, dynamic process, which required an optimal fluidity of the membrane lipid bilayers. However, the absence of total inhibition of cellular uptake of EVs at 4°C suggested that a temperature-independent mechanism might also be involved, such as the recognition between receptor and/or adaptor molecule(s) between the EV membrane and cell plasma membrane.

Homologous versus heterologous cellular uptake

To evaluate the efficiency of homologous and heterologous EV-to-cell transfer, GFP-tagged EVs (MVs^{GFP} and EXos^{GFP}) were prepared from HAdV5-GFP-transduced A549 cells. The advantage of using GFP-loaded EVs was the high proportion of fluorescent EVs for GFP (over 80%), compared with GFP-CFTR (around 10%; refer to Fig. 4a). For homologous cellular uptake of EVs, EVs isolated from A549 cells were incubated with A549 cells, whereas for heterologous cellular uptake, EVs isolated from A549 cells were incubated with CF15 cells. Incubation was carried out at 37°C for 1, 2, 3, 4, 6, 12, and 24 hr, at an input of 2×10^4 EVs/cell. At each time point, the target cells were fixed for fluorescence microscopy and assayed by flow cytometry for the proportion of GFP-positive cells and the index of transduction efficiency (TE). The TE, expressed in arbitrary units (AU), was calculated using the following formula: TE = GFP-positive cells (%) \times MFI.³⁴

Homologous cellular uptake (Fig. 6a). About 60% of A549 cells were GFP-positive after 3 hr incubation with MVs^{GFP}, and 75% after 6 hr. The proportion of GFP-positive cells reached a plateau of 80% after 12 hr. The values obtained for EXos^{GFP}-transduced cells were lower, with 5% and 10% at 3 and 6 hr, respectively, and a plateau at

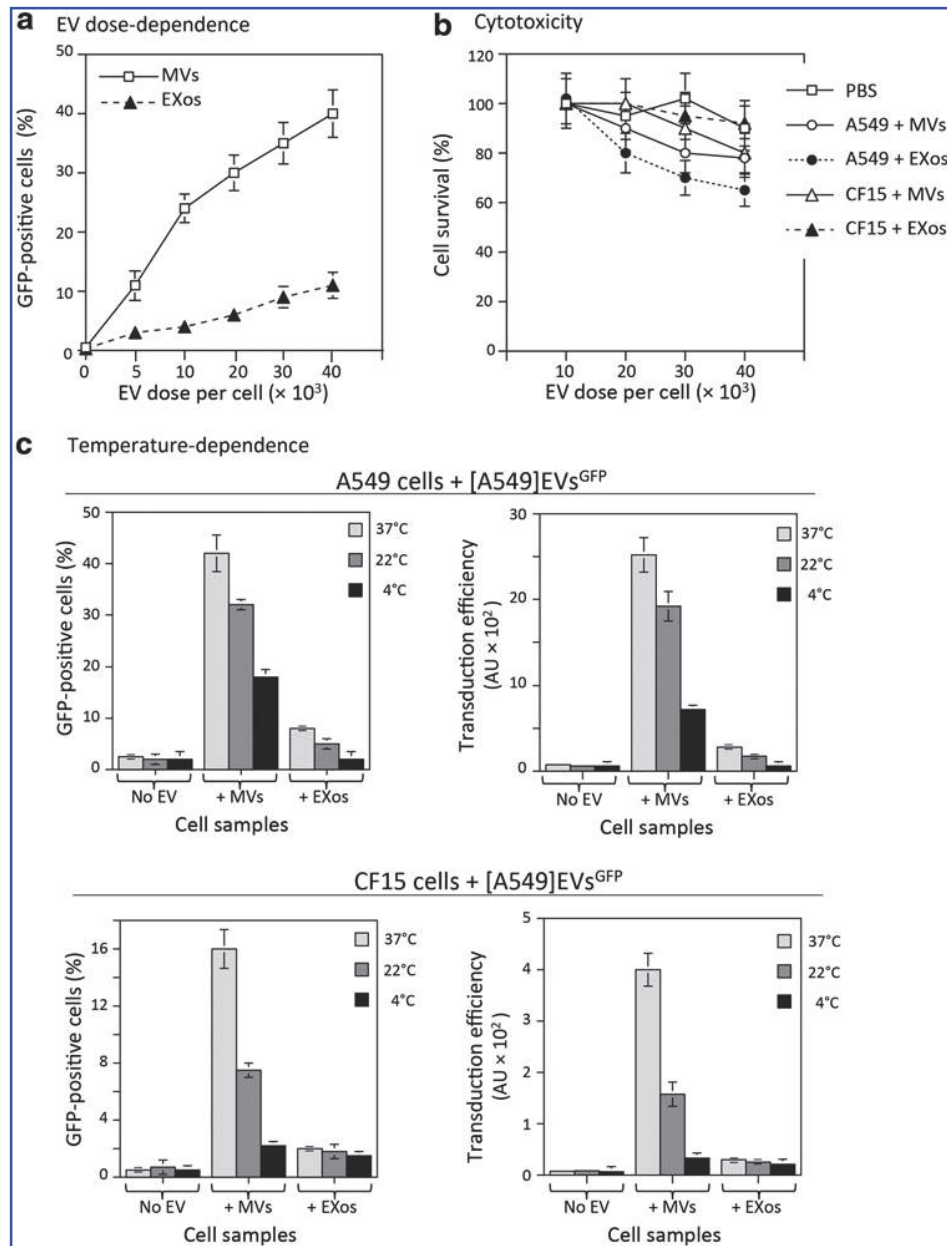


Figure 5. Dose dependence, cytotoxicity, and temperature dependence of EV-mediated transduction of target cells. **(a)** EV dose dependence. A549 cells were incubated with increasing doses of MVs^{GFP-CFTR} or EXos^{GFP-CFTR}, and the cellular GFP signal was analyzed by flow cytometry (mean \pm SEM; $n=4$). **(b)** Cytotoxicity. A549 or CF15 cells incubated with MVs^{GFP-CFTR} or EXos^{GFP-CFTR} at different doses were analyzed for cell survival using the MTT assay. Data shown are the percentages of viable cells compared with untreated samples. **(c)** Temperature dependence. Target cells, A549 (homologous EV-to-cell transfer; *top panels*) or CF15 (heterologous EV-to-cell transfer; *bottom panels*), were incubated with samples of MVs^{GFP-CFTR} or EXos^{GFP-CFTR} (as indicated under the x axis) at the indicated temperatures. Cells were collected after 6 hr incubation, and analyzed by flow cytometry to quantitate the percentage of GFP-positive cells (*left panels*), and the transduction efficiency (*right panels*). The transduction efficiency (TE) was expressed as arbitrary units (AU), using the following formula: TE = MFI \times % GFP-positive cells. MFI, mean fluorescence intensity.

25% after 12 hr. The transduction efficiency was significantly higher with MVs^{GFP}, compared with EXos^{GFP}, with values ranging from 4- to 8-fold higher at all time points (Fig. 6a, upper and lower leftmost panels). Fluorescence microscopy observation showed that GFP dots were more abundant in MVs^{GFP}-transduced cells than in EXos^{GFP}-

transduced cells at all time points tested (Fig. 6a, upper and lower rightmost panels).

Heterologous cellular uptake (Fig. 6b). The uptake of heterologous EVs was slower, and its efficiency was significantly lower (about 2-fold), compared with homologous EV uptake: only 40% MVs^{GFP}-

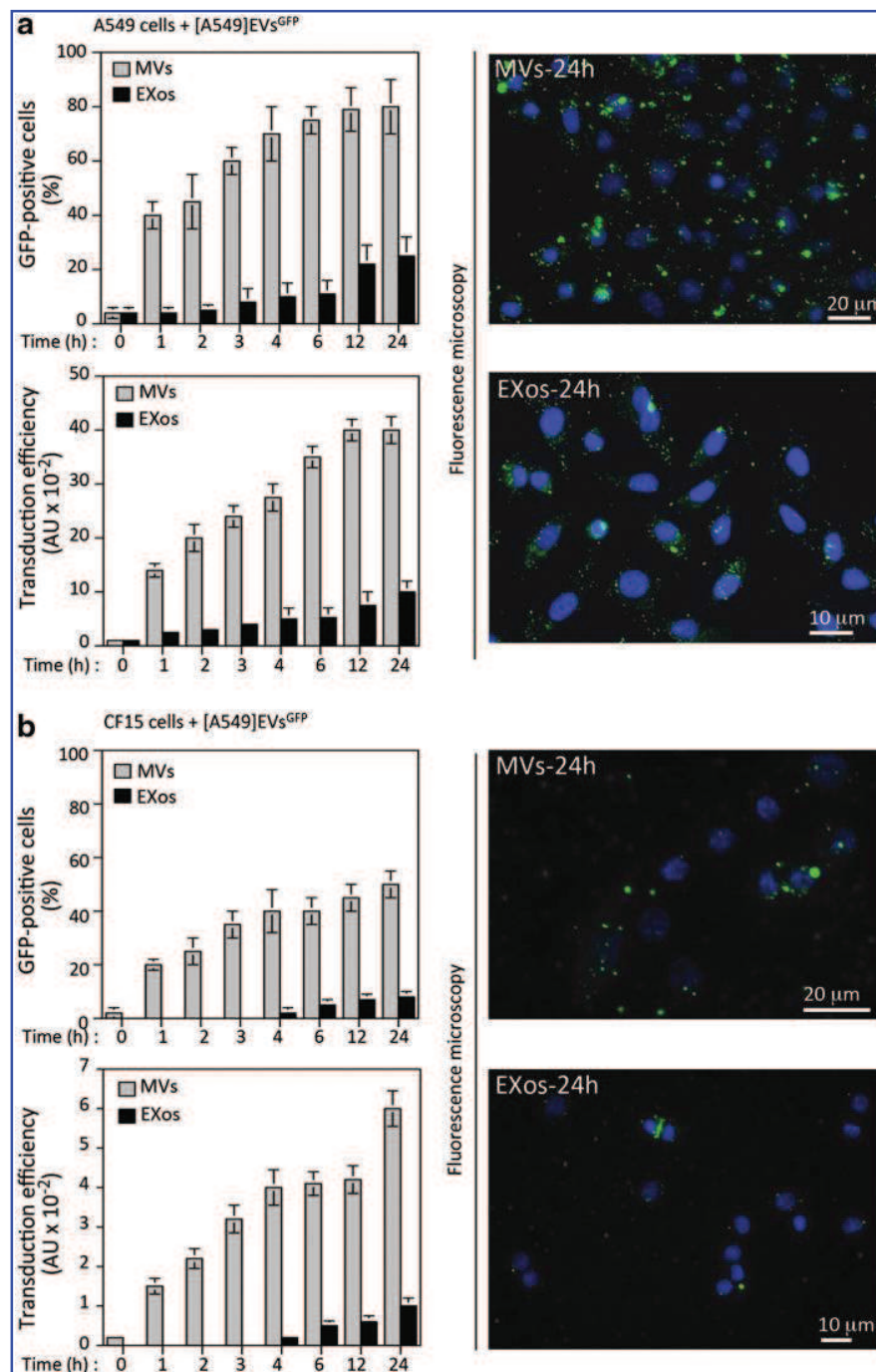


Figure 6. Homologous versus heterologous EV-mediated cell transduction. **(a)** Homologous EV-to-cell transfer. A549 cells were incubated with MVs^{GFP} or EXos^{GFP} isolated from HAdV5-GFP-transduced A549 cells, collected at different times, and analyzed by flow cytometry (*left panels*), and epifluorescence microscopy (*right panels*). **(b)** Heterologous EV-to-cell transfer. CF15 cells were incubated with MVs^{GFP} or EXos^{GFP} isolated from HAdV5-transduced A549 cells, collected at different times as in **(a)** and analyzed by flow cytometry (*left panels*), and epifluorescence microscopy (*right panels*). Data presented in the *left panels* are mean \pm SEM ($n=3$). The images of epifluorescence microscopy shown in the *right panels* were taken after 24 hr incubation.

transduced CF15 cells were found to be GFP-positive at 12 hr, and a maximum of 50% at 24 hr. This difference was also observed with EXos^{GFP}-transduced CF15 cells, which showed no fluorescent signal over the background before the 4 hr

time point, and a maximum value at 5% GFP-positive cells at 12 and 24 hr. As observed with A549 cells, the difference in transduction efficiency between MVs^{GFP} and EXos^{GFP} ranged between 6- and 8-fold within the late time period (Fig. 6b,

upper and lower leftmost panels), which was confirmed by fluorescence microscopy (Fig. 6b, upper and lower rightmost panels). These results suggested that the cellular uptake of EVs was more efficient in homologous EV-to-cell transfer system, compared with the heterologous type, with MVs being more efficient than EXOs in both cases.

Mechanisms of cellular uptake of EVs

Cell entry inhibitors. Metabolic inhibitors^{48,49} were used to further explore the cell entry pathway of MVs^{GFP} and EXOs^{GFP} in homologous and heterologous transfer systems. Only cytochalasin B, a cytoskeletal drug that acts as an endocytosis blocker,^{48,49} and the macropinocytosis inhibitor amiloride⁵⁰ provoked a significant diminution (about twofold) of the GFP signal in EV-treated cells. This suggested that clathrin-dependent endocytosis and macropinocytosis were involved to some extent in the cellular uptake of EVs. The effects observed with the other drugs were moderate, and varied with the cell types and the nature of the EVs, in the negative or positive sense (data not shown). This implied that MVs and EXOs used different mechanisms and/or alternative internalization pathways, of which the relative importance would depend on the nature of EVs and the type of target cells. In the presence of a given metabolic inhibitor responsible for the blockade of one pathway, the EVs might be redirected to alternative routes for cell entry, which, paradoxically, would result in an apparent higher transduction efficiency. This confirmed the diversity of mechanisms of cellular attachment and uptake of EVs previously observed.^{21,51}

Imaging of EV–cell interaction by electron microscopy. Monolayers of A549 cells were incubated with A549-issued MVs^{GFP} or EXOs^{GFP} (2×10^4 EVs/cell) at 37°C for 2 hr, and the cells were fixed and processed for EM. For both MVs and EXOs, EM observation showed close contacts between EVs and the cell plasma membrane (Supplementary Fig. S2a, b), and between intravesicular EVs and the vesicular membrane (Supplementary Fig. S2d, f). Electron-dense material connecting MVs and EXOs with plasma and vesicular membranes was also visible. These images were reminiscent of a receptor–ligand recognition, usually followed by cell internalization via membrane fusion, or alternatively via endocytosis (Supplementary Fig. S2d, f). Images evoking macropinocytosis were also observed with both MVs and EXOs (Supplementary Fig. S2c, e).

Confocal fluorescence microscopy of EV–cell interaction. The intracellular trafficking of EVs after their cellular uptake was investigated using GFP-loaded EVs, and antibodies against markers of the early, intermediate, and late vesicular compartments of the endocytic pathway. These included antibodies against Rab5, Rab4a, Rab11, and Lamp1. A549 cells were incubated with MVs^{GFP} and EXOs^{GFP} at an input of 2×10^4 EVs/cell, harvested at 2, 6, and 24 hr posttransduction, permeabilized, and reacted with primary antibodies followed by secondary, red-fluorescent antibodies. The cell samples were then processed for confocal fluorescence microscopy. No colocalization with Rab5, Rab4a, or Rab11 was detectable with MVs^{GFP} or EXOs^{GFP} at any of the time points considered (not shown). At 24 hr posttransduction, however, some degree of colocalization of EXOs^{GFP} and Lamp1 was observed (Supplementary Fig. S3a). Colocalization with Lamp1 was not observed with MVs^{GFP}, even at late times posttransduction (Supplementary Fig. S3b). These observations indicated that the MVs and EXOs did not accumulate in the same vesicular compartments at late times after cell entry, and suggested that MVs and EXOs differed in their intracellular trafficking.

Kinetics of EV-mediated delivery of GFP-CFTR to CF target cells

MVs^{GFP-CFTR} and EXOs^{GFP-CFTR} isolated from HAAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells were incubated with CF15 target cells at 2×10^4 EVs/cell for 6 hr at 37°C, and cells collected at time points 6, 12, 24, and 48 hr after transduction. At 6 hr posttransduction, the percentage of GFP-CFTR-positive cells was 10–15% for MVs^{GFP-CFTR}-transduced cells and 5–6% for EXOs^{GFP-CFTR}-transduced cells. At 12 hr, the percentage of GFP-CFTR-positive cells decreased for both types of EVs, with only 3% fluorescent cells with MVs^{GFP-CFTR}, and less than 2% for EXOs^{GFP-CFTR} (Fig. 7a, left panel). Interestingly, the proportion of GFP-CFTR-positive cells progressively increased at later times posttransduction with both types of EVs, with 8–9% GFP-CFTR-positive cells at 48 hr for MVs^{GFP-CFTR}-transduced cells, and 5–6% for EXOs^{GFP-CFTR}-transduced cells (Fig. 7a, left panel). The TE values followed a similar U-shaped pattern (Fig. 7a, right panel), and the transduction efficiency was consistently 5–10-fold higher with MVs^{GFP-CFTR} than with EXOs^{GFP-CFTR}.

The transfer of mRNA^{GFP-CFTR} molecules to target cells was evaluated by RT-PCR and qRT-PCR analyses, using primers overlapping the GFP

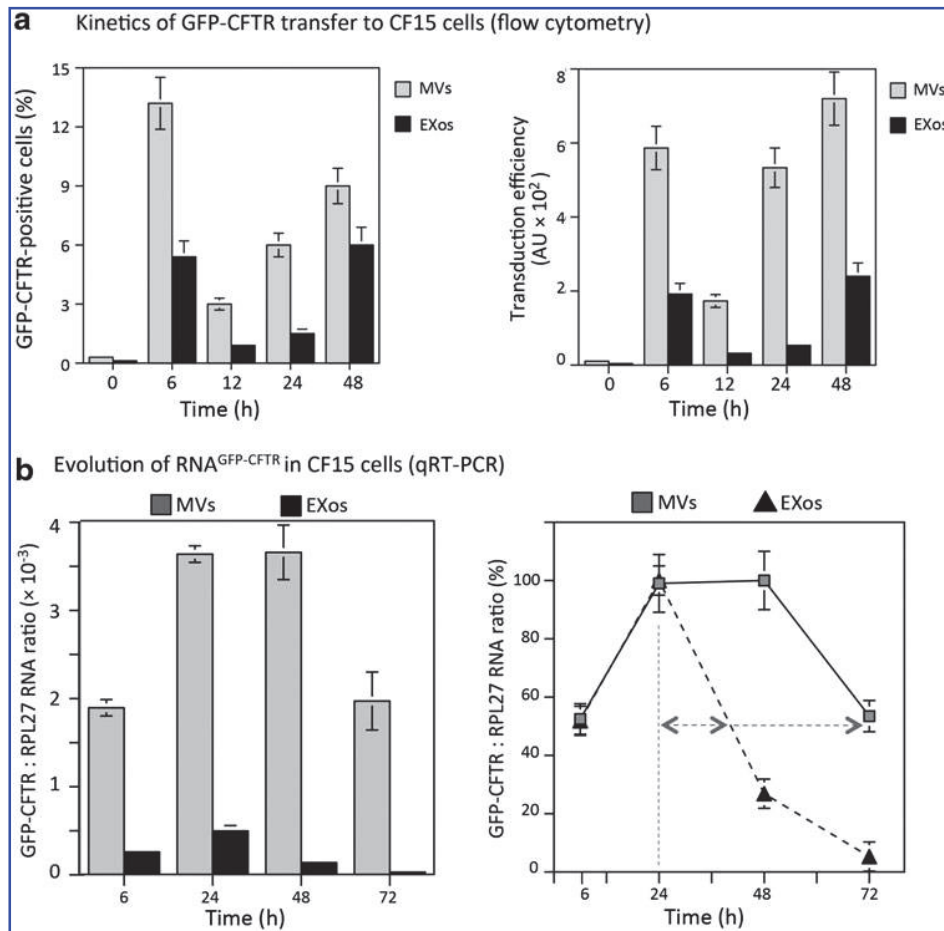


Figure 7. Kinetics and efficiency of EV-mediated transfer of GFP-CFTR into target cells. **(a)** Flow cytometry. CF15 cells were incubated with MVs^{GFP-CFTR} or EXos^{GFP-CFTR} isolated from HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells for different time periods at 37°C. Cell samples were collected at times indicated in the x axis, and analyzed for the percentage of GFP-CFTR-positive cells (*left panel*), and transduction efficiency (*right panel*). **(b)** Quantitative RT-PCR analysis. The RNA^{GFP-CFTR} content was determined by qRT-PCR, using a pair of primers overlapping the GFP-CFTR junction (amplified fragment: 196 nt). The RPL27 RNA was used as the internal standard. Data shown are GFP-CFTR to RPL27 RNA ratios (*left panel*). Normalized values of GFP-CFTR/RPL27 RNA ratios, with the 100% value attributed to the maximal ratio obtained (*right panel*). The double-head arrow represents the estimated half-life of RNA^{GFP-CFTR} molecules in MV- and EXo-transduced cells, respectively (mean ± SEM; n=3).

and CFTR sequences, and RPL27 RNA as the internal control. Reaction was performed on samples of MVs^{GFP-CFTR}- and EXos^{GFP-CFTR}-transduced CF15 cells, harvested at different time points after EV-transduction. Both types of samples contained mRNA^{GFP-CFTR} as early as 6 hr posttransduction (Fig. 7b, left panel). Interestingly, in MVs^{GFP-CFTR}-transduced cells, the number of mRNA^{GFP-CFTR} copies increased between 6 and 24 hr posttransduction and remained stable until 48 hr, before decreasing progressively. In EXos^{GFP-CFTR}-transduced cells, however, no plateau was observed between 24 and 48 hr, and the mRNA^{GFP-CFTR} content rapidly decreased after 24 hr, to almost undetectable levels at 72 hr. The difference in mRNA^{GFP-CFTR} levels between MVs^{GFP-CFTR}- and EXos^{GFP-CFTR}-transduced CF15 cells was esti-

mated to be 5–7-fold between 6 and 24 hr, and 25–30-fold between 48 and 72 hr (Fig. 7b, left panel).

The half-life of intracellular mRNA^{GFP-CFTR} transferred, deduced from the kinetic curves, was $t_{1/2}$ = 48 hr for MVs^{GFP-CFTR}, and $t_{1/2}$ = 16 hr for EXos^{GFP-CFTR} (Fig. 7b, right panel), that is, three times shorter in EXos^{GFP-CFTR}-transduced cells compared with MVs^{GFP-CFTR}-transduced cells. These results suggested that the cellular uptake of heterologous EVs by the target cells CF15 was a progressive process that prolonged until 24 hr after the initial EV-cell contact. These results also suggested that the mRNA^{GFP-CFTR} molecules conveyed by MVs^{GFP-CFTR} into CF15 cells did not follow the same metabolic pathway as those conveyed by EXos^{GFP-CFTR}, and/or did not accumulate in the same cellular compartments at late times after

transfer. These two possibilities, which are not mutually exclusive, were consistent with the observation by confocal fluorescence microscopy, suggesting different cell trafficking pathway for MVs and EXOs (refer to Supplementary Fig. S3).

Vector DNA, carried over by EVs, was also detected in EV-transduced CF15 cells. Quantitative PCR analysis using primers specific of the *GFP-CFTR* junction showed that there was 50–80-fold less vector DNA in $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$ -transduced cells compared with $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ -transduced cells (Supplementary Fig. S1b). There was no increase in the vector DNA content between 24 and 48 hr posttransduction. There was no detectable adenovirus hexon gene transcript in $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ - or $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$ -transduced cells (not shown). These results suggested that the template of the amplified DNA fragments in both EVs and EV-transduced cells consisted of incomplete or fragmented vector DNA, naked or partially uncoated.

Restoration of chloride (Cl^-) channel function in CF cells transduced by CFTR-loaded EVs

The CF15 cells, which carry the deltaF508 mutation in the *CFTR* gene, are defective in the CFTR Cl^- channel function. The next important issue to address was whether transduction of CF15 cells by CFTR-loaded EVs was able to restore or correct the CFTR Cl^- channel function in these cells. We therefore tested for the gain in Cl^- channel function in CF15 cells incubated with different doses of $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ or $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$, by measuring at 24 hr postincubation the iodide efflux using an iodide-selective microelectrode.^{26,42,43} As positive controls of vector-transduced CFTR activity,^{28,29,35} CF15 cells were transduced by HAdV5-GFP-CFTR at several vector doses. At 50 vector particles (vp) per cell, a strong and rapid response of iodide efflux was detectable as early as 1–2 min after activation (Fig. 8a). There was no detectable Cl^- channel activity at low vector doses (5 and 10 vp/cell), implying a threshold effect as previously observed in human airway primary CF cells transduced by the same HAdV5-GFP-CFTR vector.^{28,29}

A dose-response study was performed with increasing transducing doses of $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ or $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$ at 1×10^4 , 2×10^4 , and 4×10^4 EVs/cell. For both $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ or $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$, none or low Cl^- channel activity (10–20 nmol I^- /min) was detected at the lowest dose of 1×10^4 EVs/cell. A modest Cl^- channel activity was detected with $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ and $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$ at the transducing dose of 2×10^4 EVs/cell (10–15 nmol I^- /min), and more importantly, a relatively high CFTR activity (40–50 nmol I^- /min) was obtained with $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ and

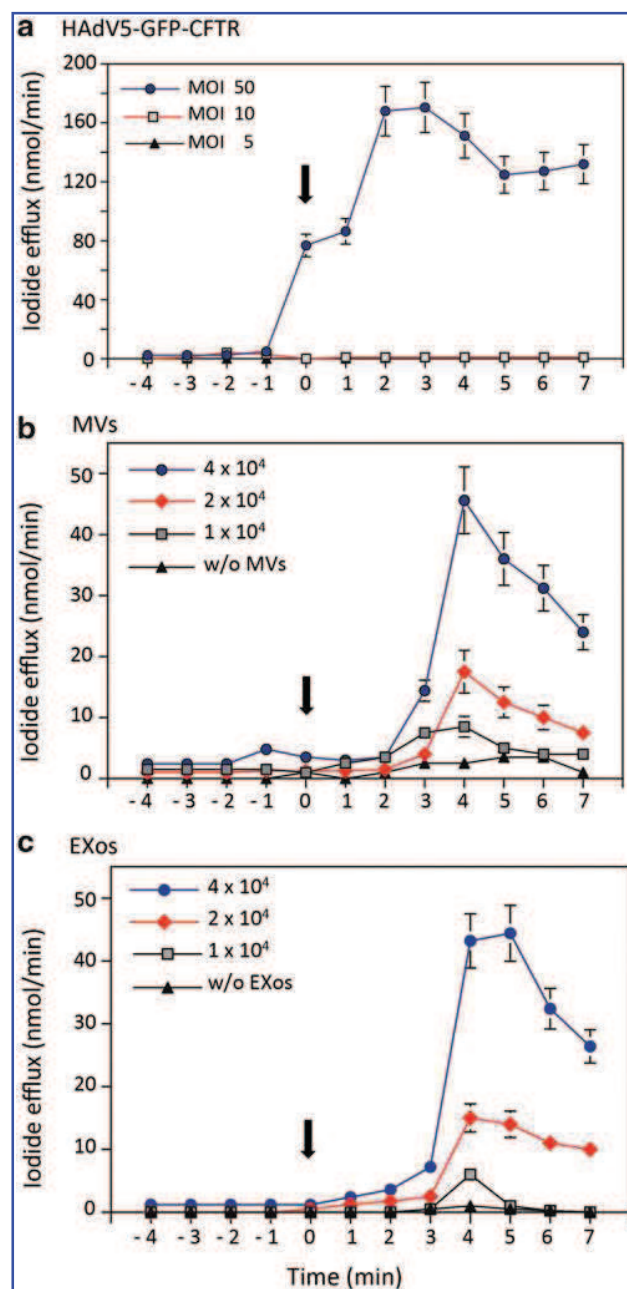


Figure 8. Measurement of the CFTR channel activity in EV-transduced CF cells. CF15 cells were incubated with $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$ or $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$ at increasing transducing doses (1×10^4 , 2×10^4 , or 4×10^4 EVs/cell). As positive control, CF15 cells were transduced with HAdV5-GFP-CFTR at increasing vector doses (5, 10, or 50 PFU/cell). At 24 hr posttransduction, cells were loaded with iodide, and cAMP-containing stimulation cocktail was added at time 0 (arrow), to activate the anion efflux through CFTR channels. The amount of iodide released from the cells was measured at 1 min intervals, using an iodide-selective electrode (mean \pm SEM; $n=3$). (a) CF15 cells transduced with HAdV5-GFP-CFTR; (b) CF15 transduced with $\text{MV}^{\text{GFP-CFTR}}$; (c) CF15 transduced with $\text{EXOs}^{\text{GFP-CFTR}}$. Color images available online at www.liebertpub.com/hum

EXos^{GFP-CFTR} used at 4×10^4 EVs/cell (Fig. 8b, c). Compared with HAdV5-GFP-CFTR-transduced cells, the peak of CFTR activity in EV-transduced cells was about 2- to 3-fold lower (40–50 vs. 160–200 nmol I[−]/min), and slightly delayed (4 min after activation; Fig. 8b, c). Nevertheless, the Cl[−] channel activity in EV-transduced CF15 cells transduced at 2×10^4 EVs/cell was within the same range of values as those measured in Calu-3 cells, which naturally express endogenous CFTR (refer to Fig. 2b,c). These promising results demonstrated that transduction of CF cells with MVs^{GFP-CFTR} or EXos^{GFP-CFTR} was able to restore the CFTR Cl[−] channel function as early as 24 hr posttransduction. The CFTR Cl[−] channel activity in these EV-transduced CF15 cells was found to persist at detectable levels up to 5 days (not shown).

DISCUSSION

In an earlier study, we demonstrated that EVs isolated from CHO cells modified to express transmembrane glycoproteins such as the Coxsackie adenovirus receptor (CAR), CD46, and the more complex dodecaspanin CFTR had the capacity to transfer the CAR-, CD46-, and CFTR-encoding mRNA molecules to naive CHO cells. This EV-to-cell transfer resulted in the gain of specific functions associated with CAR, CD46, and CFTR in the target CHO cells.²⁷ In the present study, we investigated the capacity of EVs in mediating the delivery of CFTR to human CF cells. Preliminary experiments using EVs from Calu-3 cells incubated with CF15 cells, which carry the CFTR $\Delta F508$ mutation, showed a correction of the CFTR chloride channel defect in CF15 cells. However, the level of this newly acquired CFTR activity was 10–20-fold lower than that of Calu-3 cells. We therefore explored different conditions and parameters to improve the delivery of CFTR to target cells.

Important factors in CFTR delivery included the CFTR cargo in EVs, the homology between EV-donor cells and EV-recipient cells, and the EV transducing doses. To augment the CFTR cargo in EVs, and to visualize *in situ* the transfer of the CFTR glycoprotein, we used EVs isolated from A549 cells transduced by HAdV5 vectors expressing GFP-tagged CFTR at high levels.^{28,29} Both types of EVs, MVs and EXos, were capable of incorporating and transferring GFP-CFTR to target cells in both homologous (EVs from A549 to A549 cells) and heterologous systems (EVs from A549 to CF15 cells). Not surprisingly, we found that the cellular uptake of EVs was more efficient in EV-to-cell homologous transfer. This parameter should

be taken into consideration for future clinical applications of EV-based human biotherapy, and notably for the design of autologous EV-donor cells.

Upon uptake of MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR}, the CFTR-deficient CF15 cells acquired the CFTR-associated Cl[−] channel activity as rapidly as 24 hr posttransduction. The newly acquired CFTR activity was EV-dose dependent in the range of 1×10^4 to 4×10^4 MVs or EXos per cell. However, no significant Cl[−] channel activity was detectable at doses inferior to 10^4 EVs/cell. Of note, a similar threshold effect had been observed in human airway primary CF cells transduced by adenoviral vectors.²⁹ Interestingly, the transduction efficiency of CF cells over time by MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} showed a curve with two maxima separated by a minimum of GFP-CFTR-positive cells at 12 hr posttransduction (Fig. 8a). This U-shaped pattern suggested that the fluorescent signal detected at early and late times posttransduction resulted from the contribution of two types of molecules, the GFP-CFTR glycoprotein and its encoding mRNA: (1) mature GFP-CFTR glycoproteins transferred by EVs to target cells would be responsible for the early GFP signal; (2) *de novo* synthesized GFP-CFTR, translated from the exogenous mRNA^{GFP-CFTR} by the target cell translational machinery, would be responsible for the retarded GFP signal. These results implied that EV-packaged mRNA molecules in general, and mRNA^{GFP-CFTR} in particular, played a major role in the gain of a function by target cells, as exemplified by the CFTR Cl[−] channel activity gained by CF cells. This corroborated our previous observations of the functional role of exogenous mRNA in conveying a desired biological activity in target cells.²⁷

However, EVs isolated from HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells were found to contain remnants of adenoviral vector DNA, which were transferred to target cells. Although no infectious viral vector could be rescued when MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} were incubated with *trans*-complementing HEK-293 cells, the possibility existed that the *GFP-CFTR* gene carried over by EVs was transcribed into mRNA^{GFP-CFTR}, and this neo-synthesized mRNA translated into the GFP-CFTR protein at late times after transduction. Such a mechanism was supported by a recent study on the intracellular fate of EV-transferred biomolecules, and on the active role played by a plasmid DNA compared with RNA molecules, considering their relative instability and short lifetime within the recipient cells.⁵²

In the present study, we first demonstrated that functional correction of the CFTR Cl^- channel defect in CF cells could be achieved by EVs carrying mRNA^{CFTR} isolated from Calu-3 cells. In the case of CF15 cells transduced by EVs isolated from viral vector-transduced cells, such as HAdV5-GFP-CFTR/A549 cells, the mRNA^{GFP-CFTR} responsible for the newly acquired CFTR Cl^- channel activity might result from the translation of two separate pools of molecules, mRNA^{GFP-CFTR} presynthesized in EV-donor cells (A549) and transferred by EVs to target CF cells, and mRNA^{GFP-CFTR} neosynthesized in target CF15 cells. Whatever the respective contribution of one or the other mechanism, the neosynthesis of GFP-CFTR glycoprotein molecules would explain the persistence of the CFTR activity in CF cells for several days after the EV-mediated transfer.

Flow cytometry analysis of CF15 cells transduced with MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} at the same dose, and RT-PCR determination of the mRNA^{GFP-CFTR} cellular content, suggested a higher transfer efficiency by MVs, compared with EXos. Likewise, mRNA^{GFP-CFTR} had a longer half-life in MVs^{GFP-CFTR}-transduced cells, compared with EXos^{GFP-CFTR}-transduced cells. However, the CFTR Cl^- channel activity newly acquired by EV-transduced CF15 cells and its duration over time were found to be equivalent in EXos^{GFP-CFTR}- and MVs^{GFP-CFTR}-transduced cells. These apparently contradictory results implied that only a fraction of the mRNA^{GFP-CFTR} transferred by MVs^{GFP-CFTR} was metabolically active, and that the majority remained sequestered in a dead-end cell compartment. This hypothesis was supported by fluorescence confocal microscopy, which suggested that MVs^{GFP-CFTR} and EXos^{GFP-CFTR} followed different trafficking and/or metabolic pathways after their cellular uptake by CF cells.

Collectively, our study confirmed the potential application of EVs for the delivery of CFTR to CF

cells and the correction of the chloride channel deficiency. The present limitation to the use of CFTR-loaded EVs was the threshold observed in the acquisition of the CFTR-associated channel function, which required relatively high transducing doses of EVs, compared with conventional viral vectors. This could be solved by *in vitro* transcription of mRNA^{CFTR} molecules from a CFTR-encoding plasmid, and their encapsulation at high concentration into EVs, as already developed for therapeutic RNAs and liposomes.⁵³ Such a technique could find its application for EVs isolated from individual patients, in the context of the personalized medicine of CF pathology using autologous EVs.

ACKNOWLEDGMENTS

The work in Lyon was financed by the Cystic Fibrosis French Association (VLM Contract RF20130500796 and RF20140501171). C.V. was the recipient of doctoral fellowships from the Région Rhône-Alpes (ADR Cluster-ARC 2011–2014), CMIRA Explora'doc-2012, and VLM (Vaincre la Mucoviscidose). S.S.H. is an INSERM senior scientist (Chargée de Recherche) and the recipient of a Contrat d'Interface Hospices Civils de Lyon-INSERM (2009–2013). The work in Geneva was supported by Grant #310030_134907/1 from the Swiss Science Foundation. We are grateful to Sébastien Dussurgey and Thibault Andrieu (AniRA-Cytométrie, SFR BioSciences), Bariza Blanquier (AniRA-Analyse génétique SFR BioSciences), Catherine Ott and Laurence Générénaz (Laboratoire Commun de Recherche BioMérieux-HCL), and Nathalie Calin (ENS-Lyon) for their valuable advice and technical help. We also thank Sylvie Farget for her constant secretarial aid.

AUTHOR DISCLOSURE

No competing financial interests exist.

REFERENCES

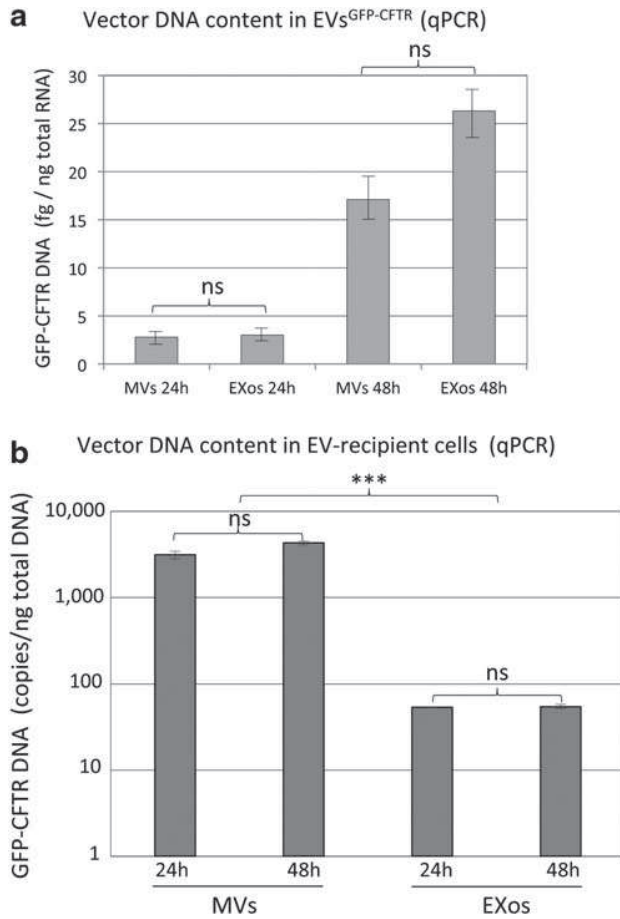
1. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015;4:27066.
2. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200:373–383.
3. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9:581–593.
4. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: Artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009;19:43–51.
5. Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovasc Res* 2013;100:7–18.
6. El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, et al. Exosome-mediated delivery of siRNA *in vitro* and *in vivo*. *Nat Protoc* 2012;7:2112–2126.
7. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73:1907–1920.
8. Bruno S, Camussi G. Role of mesenchymal stem cell-derived microvesicles in tissue repair. *Pediatr Nephrol* 2013;28:2249–2254.
9. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-

- induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1474–1483.
10. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, et al. Exosome secretion: Molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 2011;12:1659–1668.
 11. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005;106:1604–1611.
 12. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006;20:847–856.
 13. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res* 2011;1:98–110.
 14. Rak J, Guha A. Extracellular vesicles—vehicles that spread cancer genes. *BioEssays* 2012;34:489–497.
 15. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, et al. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 2012;3:124.
 16. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 2010;30:6838–6851.
 17. Vella LJ, Hill AF. Generation of cell lines propagating infectious prions and the isolation and characterization of cell-derived exosomes. *Methods Mol Biol* 2008;459:69–82.
 18. Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 2007;211:582–590.
 19. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, et al. Transferrin of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 2000;6:769–775.
 20. Arenaccio C, Anticoli S, Manfredi F, et al. Latent HIV-1 is activated by exosomes from cells infected with either replication-competent or defective HIV-1. *Retrovirology* 2015;12:e87.
 21. György B, Hung ME, Breakefield XO, et al. Therapeutic applications of extracellular vesicles: Clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:439–464.
 22. Bradbury NA. Intracellular CFTR: Localization and function. *Physiol Rev* 1999;79:S175–S191.
 23. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999;79:S23–S45.
 24. Chow YH, Plumb J, Wen Y, et al. Targeting transgene expression to airway epithelia and submucosal glands, prominent sites of human CFTR expression. *Mol Ther* 2000;2:359–367.
 25. Guo Y, Su M, McNutt MA, et al. Expression and distribution of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in neurons of the human brain. *J Histochem Cytochem* 2009;57:1113–1120.
 26. Mohamed A, Ferguson D, Seibert FS, et al. Functional expression and apical localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in MDCK I cells. *Biochem J* 1997;322:259–265.
 27. Gonzalez G, Vituret C, Di Pietro A, et al. Microparticle-mediated transfer of the viral receptors CAR and CD46, and the CFTR channel in a CHO cell model confers new functions to target cells. *PLoS One* 2012;7:e52326.
 28. Granio O, Norez C, Ashbourne Excoffon KJ, et al. Cellular localization and activity of Ad-delivered GFP-CFTR in airway epithelial and tracheal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:631–639.
 29. Granio O, Ashbourne Excoffon KJD, Henning P, et al. Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia. *Hum Gene Ther* 2010;21:1–19.
 30. Gruenert DC, Willems M, Cassiman JJ, et al. Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J Cyst Fibros* 2004;3:191–196.
 31. Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, et al. Calu-3: A human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *Am J Physiol* 1994;266:L493–L501.
 32. Jefferson DM, Valentich JD, Marini FC, et al. Expression of normal and cystic fibrosis phenotypes by continuous airway epithelial cell lines. *Am J Physiol* 1990;259:L496–L505.
 33. Pizurki L, Morris MA, Chanson M, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator does not affect neutrophil migration across cystic fibrosis airway epithelial monolayers. *Am J Pathol* 2000;156:1407–1416.
 34. Corjon S, Gonzalez G, Henning P, et al. Cell entry and trafficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon:heparan sulfate interaction. *PLoS One* 2011;6:e18205.
 35. Granio O, Porcherot M, Corjon S, et al. Improved adenovirus type 5 vector-mediated transduction of resistant cells by piggybacking on Coxsackie B-adenovirus receptor-pseudotyped baculovirus. *J Virol* 2009;83:6048–6066.
 36. DaFonseca S, Blommaert A, Coric P, et al. The 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) derivative of betulinic acid (DSB) inhibits the assembly of virus-like particles in HIV-1 Gag precursor-expressing cells. *Antiviral Ther* 2007;12:1185–1203.
 37. Dafonseca S, Coric P, Gay B, et al. The inhibition of assembly of HIV-1 virus-like particles by 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (DSB) is counteracted by Vif and requires its Zinc-binding domain. *Virol J* 2008;5:162.
 38. Franqueville L, Henning P, Magnusson MK, et al. Protein crystals in adenovirus type 5-infected cells: Requirements for intranuclear crystallogenesis, structural and functional analysis. *PLoS One* 2008;3:e2894.
 39. Hong SS, Magnusson MK, Henning P, et al. Adenovirus stripping: A versatile method to generate adenovirus vectors with new cell target specificity. *Mol Ther* 2003;7:692–699.
 40. Ftaich N, Cancia C, Viarouge C, et al. Turnover rate of NS3 proteins modulates bluetongue virus replication kinetics in a host-specific manner. *J Virol* 2015;89:10467–10481.
 41. Chanson M, Scerri I, Suter S. Defective regulation of gap junctional coupling in cystic fibrosis pancreatic duct cells. *J Clin Invest* 1999;103:1677–1684.
 42. Long KJ, Walsh KB. Iodide efflux measurements with an iodide-selective electrode: A non-radioactive procedure for monitoring cellular chloride transport. *Meth Cell Sci* 1997;19:207–212.
 43. Aleksandrov AA, Kota P, Aleksandrov LA, et al. Regulatory insertion removal restores maturation, stability and function of DeltaF508 CFTR. *J Mol Biol* 2010;401:194–210.
 44. Sumarheni S, Hong SS, Josserand V, et al. Human full-length coagulation factor X and a GLA domain-derived 40-mer polypeptide bind to different regions of the adenovirus serotype 5 hexon capsomer. *Hum Gene Ther* 2014;25:339–349.
 45. Zhu Y, Chidekel A, Shaffer TH. Cultured human airway epithelial cells (Calu-3): A model of human respiratory function, structure, and inflammatory responses. *Crit Care Res Pract* 2010;2010:ID 394578.
 46. Kesimer M, Scull M, Brighton B, et al. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: A possible role in innate defense. *FASEB J* 2009;23:1858–1868.
 47. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell Vesic* 2013;2:19861.
 48. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422:37–44.
 49. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell Logist* 2012;2:203–208.
 50. West M, Bretscher M, Watts C. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol* 1989;109:2731–2739.
 51. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesic* 2014;3:24641.
 52. Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, et al. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E1433–E1442.
 53. Wang Y, Su H-H, Yang Y, et al. Systemic delivery of modified mRNA encoding Herpes simplex virus 1 thymidine kinase for targeted cancer gene therapy. *Mol Ther* 2013;21:358–367.

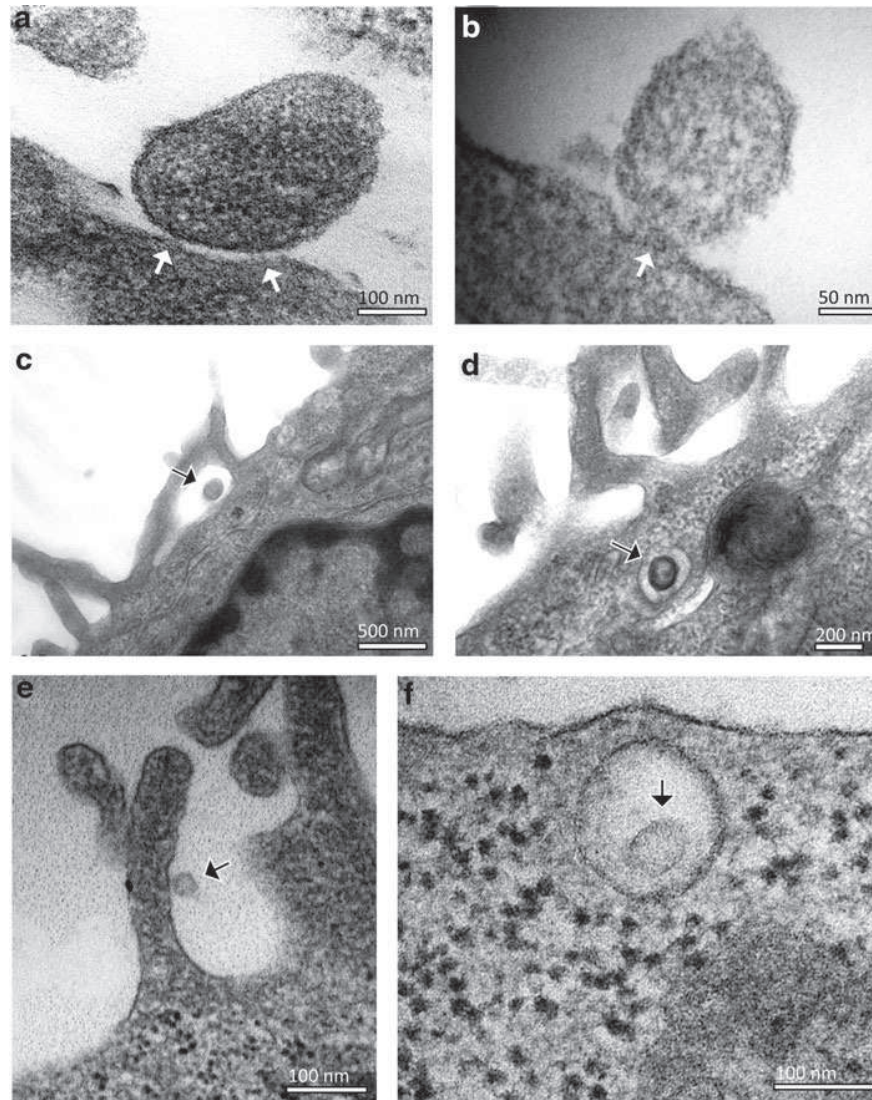
Received for publication October 27, 2015;
accepted after revision January 25, 2016.

Published online: January 26, 2016.

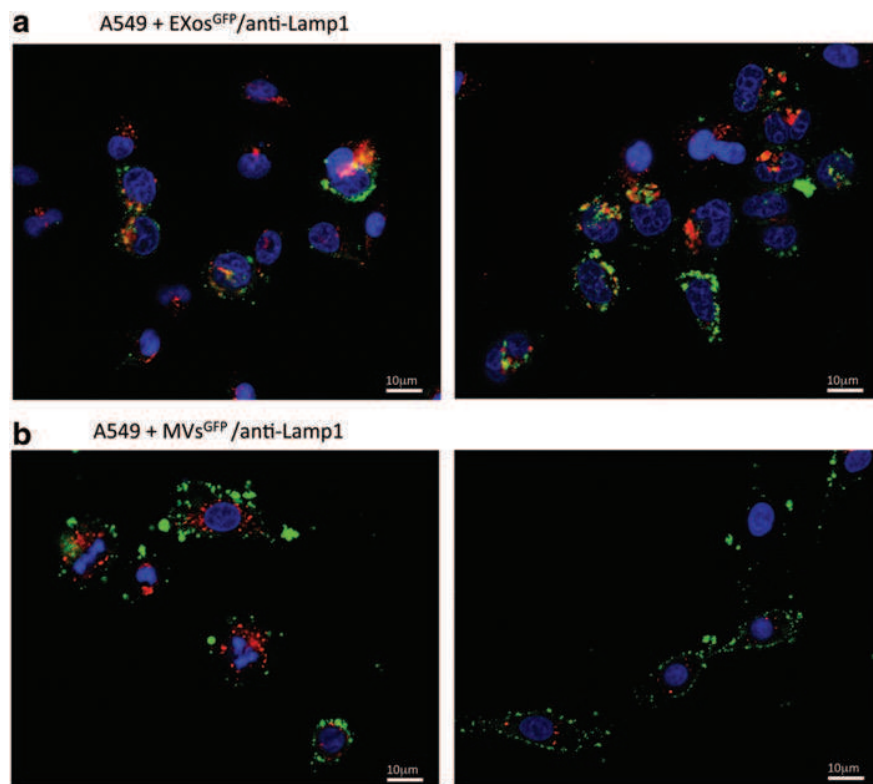
Supplementary Data



Supplementary Figure S1. Vector DNA content in EVs and EV-transduced cells. **(a)** EVs^{GFP-CFTR}. Quantitative PCR was performed on MVs^{GFP-CFTR} and EXOs^{GFP-CFTR} from HAdV5-GFP-CFTR-transduced A549 cells collected at 24 and 48 hr after transduction, using the pair of primers specific for the *GFP-CFTR* junction. Results are expressed as femtograms (fg) DNA per ng total RNA extracted from EVs (mean \pm SEM; $n=3$). **(b)** EVs^{GFP-CFTR}-transduced cells. Quantitative PCR analysis of MVs^{GFP-CFTR}- and EXOs^{GFP-CFTR}-transduced CF15 cells, harvested at 24 and 48 hr after EV-mediated transduction, was performed as above, using the primers specific for the *GFP-CFTR* junction. Results are expressed as the number of DNA copies per ng total DNA extracted (mean \pm SEM; $n=3$); ns, not significant; *** $p \leq 0.001$. Note the log scale of the y axis. EVs, extracellular vesicles; EXOs, exosomes; MVs, microvesicles.



Supplementary Figure S2. Electron microscopy (EM) of EV-target cell early interaction. A549 cells were incubated with MVs (**a–d**) or EXOs (**e, f**) isolated from A549 cells (homologous EV-to-cell transfer) for 2 hr at 37°C, and processed for EM. In panels (**a**) and (**b**), white arrows point to electron-dense material connecting MVs to the cell plasma membrane. In panels (**c**) to (**f**), arrows point to extracellular EVs (**c, e**), or to cell-internalized EVs (**d, f**).



Supplementary Figure S3. Fluorescence confocal microscopy of the EV pathway in target cells. A549 cells were incubated with **(a)** EXos^{GFP} or **(b)** MVs^{GFP}. At 24 hr postincubation, the cells were fixed and reacted with anti-Lamp1 mouse monoclonal antibodies, followed by Alexa568-labeled antimouse IgG antibodies. The cell nuclei were counterstained with DAPI.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, ce travail confirme la preuve de concept du transfert de matériel biologique à des cellules épithéliales pulmonaires par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires.

Dans l'optique d'utiliser des cellules humaines immunocompatibles cultivées *ex vivo* pour la production des vésicules, nous avons utilisé des cellules épithéliales pulmonaires connues pour exprimer fortement la protéine CFTRwt : les Calu-3. Nous avons montré qu'il est possible d'utiliser ces cellules non modifiées *in vitro*, pour apporter une nouvelle fonction aux cellules cibles, avec un résultat modeste à améliorer.

Nous avons alors décidé d'utiliser un système permettant de surexprimer la protéine d'intérêt, fusionnée à la protéine GFP afin de la suivre par fluorescence dans nos expériences d'optimisation. Nous avons tout d'abord travaillé sur la construction de lignées stables surexprimant la protéine de fusion GFP-CFTR. Le plasmide pCEP4-EGFP-CFTR précédemment utilisé dans le modèle CHO et connu pour s'autorépliquer dans les cellules a conduit à l'obtention de cellules fluorescentes vertes. Toutefois, cette fluorescence était de faible intensité et transitoire, ne permettant pas de cultiver ces cellules pour produire des vésicules. La transfection de cellules à l'aide du plasmide pEGFP-CFTR et la sélection des clones recombinants a conduit à l'obtention de lignées fluorescentes vertes. Cependant, ces cellules n'exprimaient pas de façon stable la protéine de fusion d'intérêt GFP-CFTR, ne permettant pas de les utiliser pour la suite de l'étude. Nous avons également envisagé d'utiliser un vecteur rétroviral qui a la particularité de s'intégrer dans les cellules hôtes. Le clonage du vecteur intermédiaire pLXRN-EGFP-CFTR nécessaire à la création de ce vecteur rétroviral a été réalisé dans ce travail de thèse (§2.1.3 p100) mais les résultats préliminaires ne nous ont pas encouragé à poursuivre dans cette voie. Par ailleurs, selon l'endroit où le vecteur s'intègre dans le génome, il peut conduire à l'expression de protéines pro- ou anti-apoptotiques pouvant être retrouvées dans les EV et avoir des effets néfastes sur les cellules cibles. La construction d'une telle lignée nécessite une sélection monoclonale ainsi que l'étude de l'effet de l'insertion du transgène sur le comportement de la cellule hôte.

Face aux difficultés rencontrées pour construire des lignées humaines stables exprimant notre protéine d'intérêt, nous avons alors choisi d'utiliser un système d'expression transitoire : le vecteur adénoviral Ad5-GFP-CFTR développé et validé précédemment au sein de l'équipe (Granio et al., 2007). Ce dernier a permis de produire des vésicules extracellulaires d'intérêt, contenant à la fois la protéine et l'ARNm codant la protéine de fusion GFP-CFTR. Par ailleurs, nous avons montré que ces vésicules sont capables de transférer la protéine et l'ARNm aux cellules cibles, ainsi que de leur apporter une nouvelle fonctionnalité en tant que canal à ions chlorure. Un faible nombre de cellules exprimant la protéine d'intérêt est capable de générer un signal 2 à 3 fois inférieur à celui obtenu pour les cellules donneuses. Ceci est en accord avec ce qui a été précédemment décrit dans la littérature, où 5 à 10% de cellules traitées suffisent à restaurer la fonctionnalité d'un épithélium (Johnson et al., 1992; Farnen et al., 2005).

Ainsi, les vésicules extracellulaires pourraient être envisagées comme nouvelle application thérapeutique de la mucoviscidose. Nous avons montré que les Exo semblent plus actifs que les MV sur le plan de la fonctionnalité des molécules biologiques transférées. Par ailleurs, de par leur homogénéité et leur petite taille, ils semblent offrir un meilleur potentiel pour répondre aux exigences de mise sur le marché et notamment de standardisation de la production. La petite taille des Exo permet également d'envisager une meilleure accessibilité aux cellules cibles dans le tractus respiratoire. En outre, le protocole de purification pourrait être amélioré. L'ultracentrifugation intermédiaire à 30 000 g resterait nécessaire afin d'éviter la subdivision artificielle des plus grosses vésicules en des vésicules plus petites. Il serait intéressant d'ajouter une étape de filtration avant de réaliser l'ultracentrifugation à 100 000 g, afin d'éliminer les microvésicules et les éventuels corps apoptotiques contaminants et ainsi obtenir un meilleur degré de pureté. Par ailleurs, des agrégats

protéiques peuvent co-sédimer à 100 000 g. Afin de purifier davantage les vésicules et éliminer ces agrégats, il conviendrait de réaliser l'ultracentrifugation sur un coussin de saccharose à 15% (p/vol), dont la densité ($\rho = 1,06$) permettrait de sédimenter les vésicules extracellulaires, tout en retenant les impuretés, moins denses, à la surface du coussin. Nous avons envisagé de réaliser une chromatographie d'affinité à l'aide d'anticorps spécifiques comme Tsg-101 ou CD63. L'élution est une étape critique à optimiser de manière à préserver l'intégrité des vésicules. La littérature évoque également d'autres techniques de purification comme la chromatographie d'exclusion pour éliminer les composés inférieurs à 50 000 kDa. A ce jour, aucune méthode de purification n'est parfaite et les recherches s'intensifient pour standardiser les procédures d'une part et développer de nouvelles technologies d'autre part.

Dans ce travail de thèse, nous avons également cherché à étudier le mécanisme d'internalisation des EV. Cela a été possible grâce à la protéine GFP, retrouvée dans la majorité des MV et des Exo produites par les A549-Ad5-GFP. Les expériences réalisées à différentes températures ont montré que l'internalisation des EV est un processus dynamique, température dépendant, qui requiert une fluidité optimale de la membrane lipidique, et laisse suggérer qu'il y a également un mécanisme de fusion qui opère, puisque ce dernier est indépendant de l'actine et de l'énergie. Cependant, l'absence d'inhibition totale du signal à 4°C semble indiquer que d'autres processus mettant en jeu des récepteurs membranaires sont impliqués. Nous avons notamment mis en évidence des phénomènes d'endocytose clathrine-dépendant ou encore de macropinocytose, grâce à l'étude de l'effet de différents inhibiteurs métaboliques mais aussi de clichés de microscopie électronique à transmission. Ceci confirme la diversité des mécanismes impliqués dans l'internalisation des EV. Pour explorer plus avant le mécanisme d'entrée des EV dans les cellules cibles, il serait intéressant d'étudier les cellules traitées par les différents inhibiteurs métaboliques au microscope à épifluorescence. Ceci nous permettrait de mieux interpréter les résultats obtenus lors de nos expériences de cytométrie en flux.

La suite de ce projet consisterait à tester l'efficacité des EV sur des cellules primaires de patients, cultivées de manière à mimer l'épithélium bronchio-alvéolaire. Des cellules primaires provenant de sujets sains exprimant la protéine CFTRwt de manière endogène doivent être utilisées comme contrôle positif afin de connaître l'efficacité de correction des EV par rapport à des valeurs attendues *in vivo*. Par ailleurs, les cellules de l'épithélium sont des cellules différenciées qui se divisent peu. En outre, le cycle infection/inflammation présent chez les patients atteints de mucoviscidose conduit à l'accumulation de cellules immunitaires et d'ADN bactérien dans le poumon, augmentant la viscosité du mucus et accentuant le problème d'accessibilité des vecteurs thérapeutiques. Il est donc nécessaire d'améliorer encore l'efficacité des vecteurs *in vitro* afin d'optimiser leur efficacité *in vivo*.

Pour cela, nous avons envisagé plusieurs perspectives, visant à travailler sur l'optimisation de leur capture par les cellules cibles, mais aussi sur leur enrichissement en matériel biologique d'intérêt.

Afin d'optimiser la capture des EV par les cellules différenciées, il serait particulièrement intéressant de pseudotyper les EV. Pour cela, il convient de co-transfecter ou co-transduire les cellules donneuses avec une cassette codant la protéine d'intérêt. Les EV ainsi pseudotypés pourraient alors être adressés spécifiquement à l'épithélium respiratoire à l'aide d'un récepteur spécifique. Pour le pseudotypage, nous pouvons envisager d'utiliser une protéine ligand dont le récepteur est situé à la membrane apicale des cellules épithéliales pulmonaires, comme le récepteur CD46 par exemple, qui a précédemment été étudié sur le modèle CHO (§1.B p85). Nous pensons également à l'utilisation de la protéine VSV-G, connue pour ses propriétés fusogéniques, et dont l'efficacité sur cellules primaires a été démontrée (Mangeot et al., 2011). Cette équipe utilise le terme de gésicules pour nommer ses vésicules pseudotypées VSV-G. Nous pourrions aussi envisager d'utiliser d'autres protéines de fusion virale comme l'hémagglutinine GP75 du virus humain parainfluenza D, ou encore la protéine GP64 du

baculovirus AcMNPV efficace pour transduire les cellules primaires murines de l'épithélium nasal murin (Sinn et al., 2005). Ces pseudotypages sont prometteurs pour améliorer l'entrée des EV dans les cellules mais ils impliquent une étude approfondie puisqu'ils nécessitent une modification génétique des cellules donneuses.

La deuxième approche pour améliorer l'efficacité des EV consisterait à les enrichir *in vitro* en matériel biologique d'intérêt, dans notre cas en ARNm codant la protéine GFP-CFTR et *in fine* en ARNm codant la protéine CFTR. Cette approche présenterait l'avantage de pouvoir isoler les cellules du patient lui-même sans modification *ex vivo*. Il suffirait alors de récupérer et purifier le surnageant de culture des cellules de patient, puis d'enrichir les EV *in vitro*. L'enrichissement de vésicules a déjà montré son efficacité avec de petits acides nucléiques tels que des siRNA ou encore des miRNA, dans le cadre d'application thérapeutique de maladies comme par exemple Alzheimer (Alvarez-Erviti et al., 2011). Des essais cliniques ont par ailleurs été mis en œuvre, illustrant la faisabilité de l'utilisation des Exo dans un contexte humain (Gyorgy et al., 2015). Nous avons commencé à travailler sur cet aspect au laboratoire et mis en œuvre des tests de microporation d'ARNm. Ceux-ci n'ont pour l'instant pas encore abouti à des résultats satisfaisants. Un nouveau kit de transfection des Exo est par ailleurs disponible depuis peu dans le commerce. La taille de l'ARNm CFTR (§2.3.1 p42), dont la séquence codante contient plus de 4 400 nt, semble être actuellement un paramètre limitant. Nous avons parallèlement envisagé d'utiliser un système où l'ARNm GFP-CFTR serait dirigé dans des vésicules VLP « *Virus-Like Particles* » grâce aux cellules d'encapsulation HEK-293-GP2. Cependant, le clonage de la séquence d'encapsulation psi en amont de la séquence codant notre protéine d'intérêt n'a pu être mené à terme avec succès. Il est possible que la structure secondaire en épingle à cheveux de la séquence psi soit à l'origine de cette difficulté. Néanmoins cette idée pourrait être transposée et appliquée aux EV puisqu'il a été montré que les ARNm ne seraient pas dirigés vers les Exo de manière aléatoire. En effet, une étude bioinformatique des séquences exportées dans les Exo a été réalisée et a révélé la présence d'une séquence consensus mais dont la spécificité n'a pas encore été validée (Batagov et al., 2011). En outre, une récente étude a montré qu'une séquence spécifique présente dans les miRNA se liait à une ribonucléoprotéine sumoylée, entraînant son adressage aux EV (Villarroya-Beltri et al., 2013). Nous pourrions envisager d'insérer cette séquence caractéristique en amont de la séquence codant notre protéine d'intérêt de manière à diriger l'ARNm correspondant dans les Exo, et ainsi enrichir les EV en matériel biologique d'intérêt *in cellulo*.

Ces deux approches pourraient être combinées de manière à optimiser leur efficacité. Nous pourrions par exemple modifier la protéine CD63 présente de manière ubiquitaire dans les Exo, de manière à ce qu'elle présente (1) un motif reconnu par un récepteur des voies aériennes comme les aquaporines afin d'adresser les Exo spécifiquement aux cellules cibles, et (2) une queue cytoplasmique qui serait reconnue spécifiquement par notre ARNm d'intérêt de manière à les diriger spécifiquement dans les Exo. Ces expériences de pseudotypage et d'enrichissement pourraient permettre de réduire les doses utilisées et entraîner une meilleure efficacité et une meilleure tolérance du traitement.

Les études effectuées avec la Bafilomycine A1 ont mis en lumière le fait qu'une partie des EV sont en réalité séquestrées dans un compartiment intracellulaire puis dégradées. Nous pouvons imaginer que la cellule reçoit une quantité trop importante de vésicules, ce qui expliquerait qu'une partie soit dégradée. Réduire les doses en enrichissant les EV en matériel d'intérêt pourrait limiter leur dégradation et permettre ainsi une meilleure utilisation par la cellule. Le cas échéant, il serait intéressant d'étudier le mécanisme de dégradation des EV de manière à proposer des solutions afin de la limiter. Enfin, notre étude d'optimisation de la production à l'aide de l'ionophore du calcium a révélé que ce dernier est efficace pour produire plus d'EV, mais qu'elles sont moins intéressantes du

point de vue de leur contenu. Leur cytotoxicité ne permet malheureusement pas d'envisager de les produire de cette manière pour les enrichir *in vitro*.

Après avoir validé le concept sur cellules primaires et si les résultats sont convaincants, l'efficacité des EV devra ensuite être testée sur modèle animal. Afin d'optimiser la délivrance des EV dans les voies aériennes, une technologie non invasive d'imagerie est disponible à Nice sur le modèle souris et est proposée pour tester l'efficacité de différents vecteurs. Pour cela, la séquence codant le symporteur Na/I (NIS) est utilisée comme séquence nucléique d'intérêt. En effet, les radiotraceurs s'accumulent dans les cellules qui expriment NIS, et sont utilisés pour quantifier l'efficacité du transfert de gène à l'aide d'un scanner. Le modèle souris ne semble pas le plus adapté pour étudier l'accessibilité aux voies aériennes, d'autres modèles pourront ensuite être étudiés comme le modèle cuniné (lapin transgénique CF, INRA de Jouy en Josas) ou porcin (porcs CFTR -/-, Iowa EU ou INRA de Nouzilly).

Ainsi, de nombreuses études sont encore à réaliser afin d'optimiser cette approche et la rendre efficace *in vivo* chez les patients. Elle serait par ailleurs à coupler avec d'autres traitements tels que les fluidifiants bronchiques pour optimiser l'accès aux cellules épithéliales pulmonaires et ainsi leur efficacité. Il est à noter que l'environnement pulmonaire des nouveaux nés pourrait être plus propice à un tel traitement. En effet, à la naissance, les atteintes pulmonaires ne sont pas encore développées, les fonctions respiratoires commencent à se détériorer entre 3 mois et 1 an. Nous avons montré dans notre étude que le transfert semble plus efficace en système homologue qu'en système hétérologue. Il serait néanmoins intéressant d'envisager le choix des cellules souches comme cellules donneuses d'EV, dans le but de régénérer l'épithélium respiratoire des patients (Katsuda et al., 2013). Celles-ci sont en effet connues pour produire des EV en grande quantité, elles ont par ailleurs un potentiel de réparation des tissus (Turturici et al., 2014). Ainsi, l'issue serait double : apporter le matériel génétique aux cellules déjà en place pour permettre l'expression de la protéine CFTRwt et le rétablissement du phénotype sauvage, mais aussi la régénération de l'épithélium et la reconstitution du poumon malade.

L'administration des EV pourrait être réalisée par nébulisation dans le cadre d'une aérosolthérapie. En effet, le diamètre des gouttelettes d'aérosol de médicaments varie de 0,5 à 8 µm. Le tamis vibrant semble plus indiqué pour préserver les EV de la dégradation par les ultrasons ou une pression trop importante, mais une étude fondamentale sera bien sûr nécessaire pour s'assurer que les structures sont préservées. Cette méthode de traitement présente l'avantage de délivrer le médicament directement au niveau de la zone à traiter (les voies aériennes), ce qui permet d'augmenter son efficacité tout en diminuant les effets indésirables.

Pour conclure, cette approche est particulièrement intéressante à étudier et à développer puisqu'elle apporterait le produit du gène CFTRwt et permettrait ainsi de traiter toutes les mutations, y compris les plus rares et ce sans distinction de classe (§2.4.2 p48). Par ailleurs, les cellules pulmonaires se renouvellent tous les mois ; il est donc nécessaire, si le transgène n'est pas intégré dans les cellules, de renouveler le traitement régulièrement. Si les vésicules sont produites par les cellules du patient lui-même et qu'elles gardent leurs propriétés intrinsèques, elles pourraient potentiellement être inertes face au système immunitaire et ainsi garder leur efficacité au cours du temps. Cette approche s'inscrirait alors dans la médecine des 4P : prédictive, préventive, personnalisée et participative.

V. PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications

Publications incluses dans ce manuscrit :

Vituret, C., Gallay, K., Confort, M.P., Ftaich, N., Matei, C.I., Archer, F., Ronfort, C., Mornex, J.F., Chanson, M., Di Pietro, A., Boulanger, P. and Hong, S.S. (2016). Transfer of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Human Cystic Fibrosis Cells Mediated by Extracellular Vesicles. *Human Gene Therapy*. 27(2):166-83

Gonzalez, G., Vituret, C., Di Pietro, A., Chanson, M., Boulanger, P., and Hong, S.S. (2012). Microparticle-mediated transfer of the viral receptors CAR and CD46, and the CFTR channel in a CHO cell model confers new functions to target cells. *PLoS One*. 7, e52326.

Publication associée à un projet parallèle :

Chua, A.J., Vituret, C., Tan, M.L., Gonzalez, G., Boulanger, P., Ng, M.L., and Hong, S.S. (2013). A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies. *Virology Journal*. 10, 129.

Communications orales

"Membrane-derived microparticle-mediated delivery of the CFTR"

6th European CF Young Investigator Meeting, 25 au 27 avril 2012, Paris

"Transfer of the CFTR chloride channel by membrane-derived microparticles as a therapeutic approach for cystic fibrosis"

10th French-Belgian ABC meeting Brussels, 19 et 20 octobre 2012, Bruxelles (Belgique)

« Transfert intercellulaire de macromolécules bioactives : Modèle du canal à ions chlorure CFTR »
Séminaire interne UMR754, 15 novembre 2012, Lyon

« Transfert intercellulaire de macromolécules bioactives : Modèle du CFTR »
Séminaire interne Equipe du Pr Marc CHANSON, 14 janvier 2013, Genève (Suisse)

« Nouvelle approche thérapeutique de la mucoviscidose : les vésicules extracellulaires comme vecteur de macromolécules bioactives »
Journée scientifique ARC 1 Santé, 14 juin 2013, L'Isle d'Abeau

« Les vésicules extracellulaires comme vecteur de macromolécules bioactives : application à un transporteur ABC : le CFTR »
18ème journée scientifique de l'EDISS, 3 octobre 2013, Villeurbanne

Animations scientifiques / Vulgarisation / Encadrement

Participation à la fête de la Science au lycée professionnel La Mache (Lyon) :

- 2012: réécriture du fascicule et animation du jeu Ludoviro auprès d'un public de lycéens
- 2013 : création d'un atelier « Epidémie sur la RN7 : contamination, porte d'entrée des virus »

Participation aux 10 km de la course « RunInLyon 2013 » pour la promotion du jeu Ludoviro

Encadrement de Lucas LONGIN, stagiaire 1^{ère} année BTS, 7 semaines (juin & juillet 2012)

Posters

“Membrane-derived microparticles-mediated delivery of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)”

- 4th FEBS Special Meeting on ABC Proteins ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck (Autriche) du 3 au 9 mars 2012
- 13^{ème} Colloque français des Jeunes Chercheurs, Paris, 24 avril 2012
- 6th European CF Young Investigator Meeting, Paris, 25 au 27 avril 2012
- Journée scientifique ARC 1 Santé, L’Isle d’Abeau, 28 septembre 2012

“Membrane microparticles as transfer vectors of CFTR”

- 15^{ème} Colloque français des Jeunes Chercheurs, Paris, 18 février 2014
- 1^{ères} Journées francophones de la mucoviscidose, Montpellier, 28 et 29 mars 2014
- 17th Club Exocytose-Endocytose Annual Meeting, Pornichet, 22-24 mai 2014

Membrane-derived microparticles-mediated delivery of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

Cyrielle VITURET^{1,2}, Gaëlle GONZALEZ¹, Attilio DI PIETRO², Marc CHANSON³, Pierre BOULANGER¹, Saw-See HONG¹

¹Université Lyon 1 & INRA UMR754, 50, avenue Tony Gamier, 69366 Lyon cedex 06, France

²BMSI UMR5086, Université Lyon 1 & CNRS, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France

³Laboratory of Clinical Investigation III, Faculty of Medicine, University of Geneva, FMR, 64, avenue de la Roseraie, 1211 Geneva 4, Switzerland

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

- Dodecaspanin glycoprotein
- Localized at the apical pole of epithelial cells
- Functions as a chloride channel
- Deficient in cystic fibrosis

Cystic fibrosis

Genetic origin

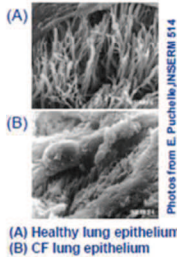
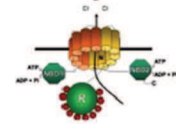
- Autosomal recessive genetic disease
- Caused by mutations in a single gene : the *cftr* gene
- More than 1900 mutations filed in 6 classes

Physiological manifestations

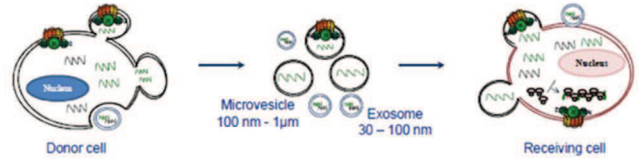
- Defective hydration of exocrine secretions resulting in plugging mucus in organs and tissues which express the *cftr*

Clinical manifestations

- Mucus obstruction of the respiratory tract
- Chronic bacterial infection of the airways
- Pancreatic insufficiency
- Gastrointestinal disturbances



Membrane-derived microparticles (MPs)



Membrane microparticles, upon release in the extracellular milieu, either spontaneously or in response to stress, can embed membrane and cytosolic components which are specific of their cellular origin.

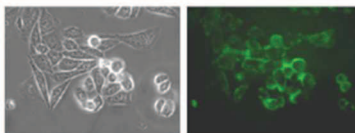
Aim of the study

Taking advantage of the membrane-derived microparticles, we tested the possibility of MP-mediated delivery of human CFTR as a potential treatment for cystic fibrosis (CF). CHO cells which constitutively express the GFP-tagged CFTR construct from an episomal plasmid (donor cells) and CHO cells which naturally lack CFTR (recipient cells) were used for the proof of concept.

Results

I- Donor cells : CHO stably expressing GFP-CFTR^{Δ5} from episomal plasmid pCEP4

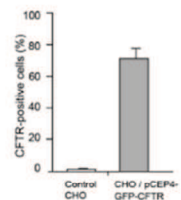
Phase-contrast and epifluorescence microscopy



GFP-CFTR localizes at the plasma membrane

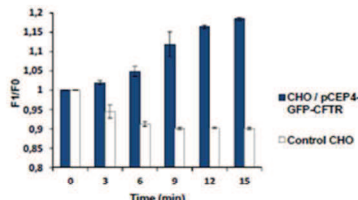
*Grano et al. (2007) AJRCMB
*Grano et al. (2010) Hum. Gene Ther.

Anti-CFTR reactivity (FACS)



Positive signal with anti-CFTR mAb demonstrates the presence of CFTR at the plasma membrane

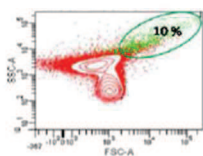
CFTR channel activity (DiSBAC₂(3) assay)



DiSBAC₂(3) assay shows that CFTR is functional as a chloride channel

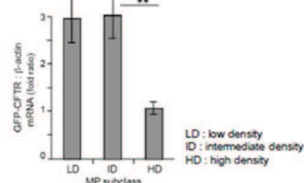
II- Microparticles released from CHO-GFP-CFTR cells

Detection of GFP-CFTR protein in microparticles (FACS)



10 % of all MP released by CHO-GFP-CFTR cells were positive for GFP-CFTR

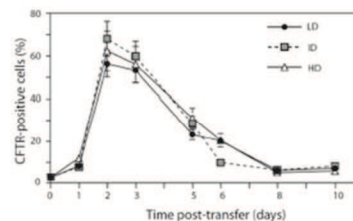
Detection of GFP-CFTR mRNA in microparticles (qRT-PCR)



All MP subclasses contained significant amounts of GFP-CFTR-encoding mRNA

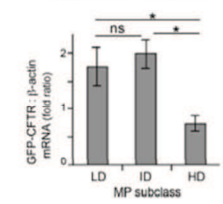
III- Recipient cells : CHO (naturally devoid of CFTR)

Cell reactivity with anti-CFTR monoclonal Ab at different times post-transfer (FACS)



Maximal display of CFTR molecules at the cell surface was observed at 48-72 h p.t, with 60-70% of CFTR-positive cells. CFTR reactivity declined with time, to reach 10-15% of CFTR-positive cells at day-5.

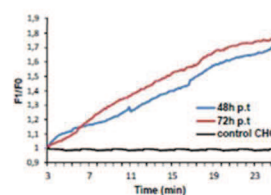
Detection of GFP-CFTR mRNA in MP transduced CHO (qRT-PCR - day 5 p.t)



All MP subclasses were found to be capable of transferring GFP-CFTR mRNA molecules to recipient CHO cells

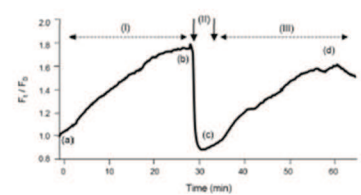
Time-lapse assay of Cl⁻ channel function : fluorescent DiSBAC₂(3)

(1) MP-transduced versus control CHO



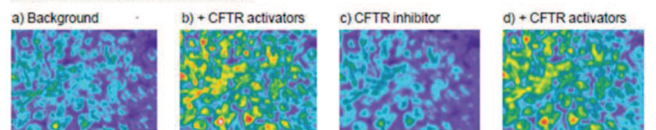
At 48h and 72h post-transfer, CFTR present at the membrane of recipient cells was functional as a chloride channel.

(2) With CFTR inhibitor and activators



GlyH-101 decreased the DiSBAC signal, as expected for a CFTR inhibitor. This result confirms the functionality of CFTR.

Cell imaging corresponding to (2)



Conclusions & perspectives

Both types of CFTR molecules, transferred as mature glycoproteins or neosynthesized from exogenous mRNA^{CFTR}, were detected at the plasma membrane of recipient cells, and adopted a correct folding and membrane insertion. Our results provided the proof-of-concept that cell-derived MP could be used as vectors for the delivery of mRNA encoding therapeutic proteins to target cells, such as the human CFTR glycoprotein, and to restore the chloride channel function in CF cells. Our current work is the application of the CHO / MP model system to human primary cells.

Membrane microparticles as transfer vectors of CFTR

Cyrielle VITURET^{1,2}, Gaëlle GONZALEZ¹, Attilio DI PIETRO², Marc CHANSON³, Pierre BOULANGER¹, Saw-See HONG¹

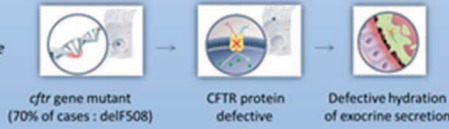
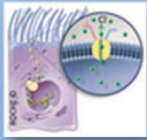
¹ Université Lyon 1 & INRA UMR754, 50, avenue Tony Garnier, 69366 Lyon cedex 06, France

² BMSSI UMR5086, Université Lyon 1 & CNRS, 7, passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France

³ Laboratory of Clinical Investigation III, Faculty of Medicine, University of Geneva, FMR, 64, avenue de la Roseraie, 1211 Geneva 4, Switzerland

CFTR & Cystic Fibrosis (CF)

CFTR (ABCC7)
Cystic Fibrosis Transmembrane
conductance Regulator



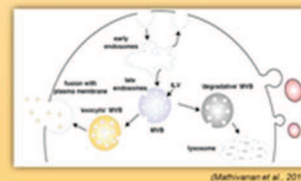
Clinical manifestations

- Mucus obstruction of the respiratory tract
- Chronic bacterial infection of the airways
- Pancreatic insufficiency
- Gastrointestinal disturbances

Origin of microparticles



Exosomes (Exos)
Exocytosis from
multivesicular bodies
(30 – 100 nm)



Microvesicles (MVs)
Plasma membrane
budding
(100 nm - 1 μm)

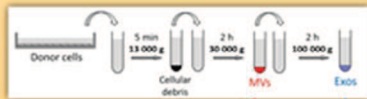
MPs, upon release in the extracellular milieu, spontaneously or in response to stress, can embed membrane and cytosolic components which are specific of their cellular origin.

Aim of this study

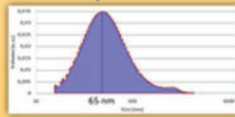
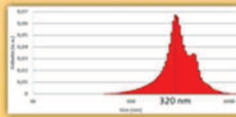
We have demonstrated the feasibility of the MPs-mediated cell-to-cell delivery of human CFTR in the CHO cell model.

- (i) To determine whether this strategy could be applied to human cells, we evaluated the capacity of MPs isolated from human airway cells expressing wtCFTR to restore the Cl⁻ channel function in CF cells. (ii) We also explored the mechanism of cellular uptake of MPs.

Purification and characterisation of MPs



DLS (Dynamic Light Scattering)



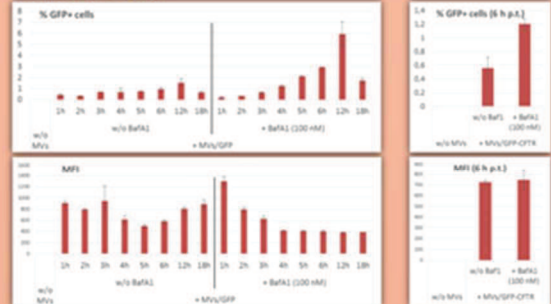
Mechanism of cellular uptake of MPs ?

Human donor cells of MPs-GFP & MPs-GFP-CFTR: A549 transduced by Ad5F35-GFP or Ad5F35-GFP-CFTR
Human recipient cells: A549

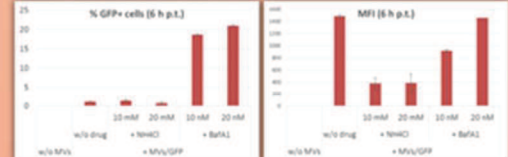
Endosomal/lysosomal drugs: Bafilomycin A1 (BafA1): inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase and fusion of endosome/lysosome. **NH₄Cl**: increases the pH of the endosome-lysosome luminal content.

Parameters measured: GFP-positive cells (%) and MFI, assayed by flow cytometry

Kinetics of BafA1 effect

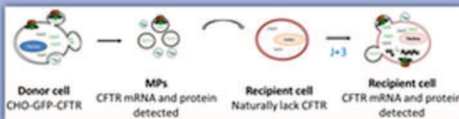


Dose-dependent effect: BafA1 & NH₄Cl

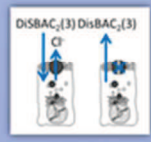


RESULTS: The percentage of GFP+ or GFP-CFTR+ cells, but not the MFI, increased in the presence of BafA1. No significant effect is observed with NH₄Cl.

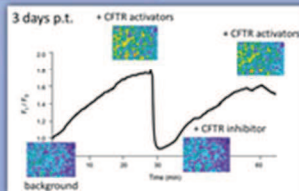
MPs-mediated transfer of CFTR : CHO cells model



Is the CFTR functional
as a chloride channel
in recipient cells ?



Potential sensitive fluorescent probe



G. Gonzalez, C. Vitoret et al. PLoS One. 2012

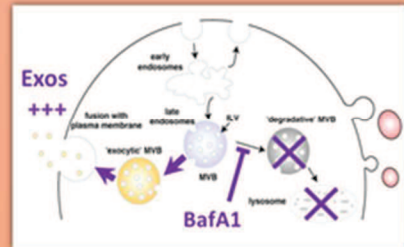
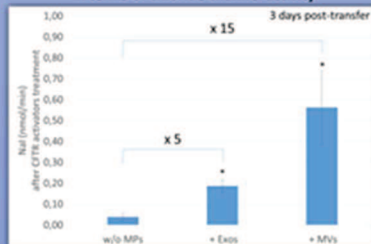
Validation on human cells ?

Human donor cells
Calu-3 : CFTRwt
Human recipient cells
CF-15 : CFTRΔF508



Iodide efflux test using
iodide sensitive microelectrode

The CFTR transferred to recipient cells is functional
in terms of chloride channel activity



INTERPRETATION: The cellular uptake of MPs occurs via endocytosis, and the MPs-mediated transfer of GFP or GFP-CFTR is BafA1-dependent. BafA1 inhibits the fusion of endosomes to degradative MVs and blocks the way to lysosomes. BafA1 favors the diverted route: it increases the extracellular release of Exos, and secondarily, increases the transfer of MPs to new cells and the final number of GFP-positive cells.

Conclusions & Perspectives

Our study confirmed the proof of concept for the MPs-mediated cell-to-cell transfer of CFTR and the possibility to restore the Cl⁻ channel function in human CF cells. The next issues to address will be to optimize the MPs production, and to increase the efficiency of MPs-mediated CFTR transfer and the persistence/stability of CFTR in target CF cells.

Mis en place et soutenu par

Rhône-Alpes

VAINCRA LA
MUCOVISCIDOSE

Lyon 1

EDISS

UNIVERSITÉ
DE GENÈVE

CNRS

BMSSI
UMR 5086

UMR5086 Biochimie Cellulaire - Lyon Sud

INRA

VI. REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Admyre,C., Johansson,S.M., Paulie,S., and Gabrielsson,S. (2006). Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur. J Immunol.* 36, 1772-1781.
- Aleksandrov,A.A., Chang,X., Aleksandrov,L., and Riordan,J.R. (2000). The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J. Physiol* 528 Pt 2, 259-265.
- Aleksandrov,A.A., Kota,P., Aleksandrov,L.A., He,L., Jensen,T., Cui,L., Gentzsch,M., Dokholyan,N.V., and Riordan,J.R. (2010). Regulatory insertion removal restores maturation, stability and function of DeltaF508 CFTR. *J. Mol. Biol.* 401, 194-210.
- Allikmets,R., Singh,N., Sun,H., Shroyer,N.F., Hutchinson,A., Chidambaram,A., Gerrard,B., Baird,L., Stauffer,D., Peiffer,A., Rattner,A., Smallwood,P., Li,Y., Anderson,K.L., Lewis,R.A., Nathans,J., Leppert,M., Dean,M., and Lupski,J.R. (1997). A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet* 15, 236-246.
- Alton,E.W., Armstrong,D.K., Ashby,D., Bayfield,K.J., Bilton,D., Bloomfield,E.V., Boyd,A.C., Brand,J., Buchan,R., Calcedo,R., Carvelli,P., Chan,M., Cheng,S.H., Collie,D.D., Cunningham,S., Davidson,H.E., Davies,G., Davies,J.C., Davies,L.A., Dewar,M.H., Doherty,A., Donovan,J., Dwyer,N.S., Elgmati,H.I., Featherstone,R.F., Gavino,J., Gea-Sorli,S., Geddes,D.M., Gibson,J.S., Gill,D.R., Greening,A.P., Griesenbach,U., Hansell,D.M., Harman,K., Higgins,T.E., Hodges,S.L., Hyde,S.C., Hyndman,L., Innes,J.A., Jacob,J., Jones,N., Keogh,B.F., Limberis,M.P., Lloyd-Evans,P., Maclean,A.W., Manvell,M.C., McCormick,D., McGovern,M., McLachlan,G., Meng,C., Montero,M.A., Milligan,H., Moyce,L.J., Murray,G.D., Nicholson,A.G., Osadolor,T., Parra-Leiton,J., Porteous,D.J., Pringle,I.A., Punch,E.K., Pytel,K.M., Quittner,A.L., Rivellini,G., Saunders,C.J., Scheule,R.K., Sheard,S., Simmonds,N.J., Smith,K., Smith,S.N., Soussi,N., Soussi,S., Spearing,E.J., Stevenson,B.J., Sumner-Jones,S.G., Turkila,M., Ureta,R.P., Waller,M.D., Wasowicz,M.Y., Wilson,J.M., and Wolstenholme-Hogg,P. (2015). Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir. Med* 3, 684-691.
- Alvarez-Erviti,L., Seow,Y., Yin,H., Betts,C., Lakhal,S., and Wood,M.J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 29, 341-345.
- Andersen,D.H. and Hodges,R.G. (1946). Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am. J Dis. Child* 72, 62-80.
- Andersen,D.H. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *American journal of Diseases of Children* 56, 344-399.
- Anderson,M.P., Gregory,R.J., Thompson,S., Souza,D.W., Paul,S., Mulligan,R.C., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253, 202-205.
- Andreola,G., Rivoltini,L., Castelli,C., Huber,V., Perego,P., Deho,P., Squarcina,P., Accornero,P., Lozupone,F., Lugini,L., Stringaro,A., Molinari,A., Arancia,G., Gentile,M., Parmiani,G., and Fais,S. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp. Med* 195, 1303-1316.
- Armstrong,D.K., Cunningham,S., Davies,J.C., and Alton,E.W. (2014). Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch Dis. Child* 99, 465-468.

Arnberg,N. (2012). Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors. *Trends Pharmacol Sci* 33, 442-448.

Baietti,M.F., Zhang,Z., Mortier,E., Melchior,A., Degeest,G., Geeraerts,A., Ivarsson,Y., Depoortere,F., Coomans,C., Vermeiren,E., Zimmermann,P., and David,G. (2012). Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol.* 14, 677-685.

Basso,C., Vergani,P., Nairn,A.C., and Gadsby,D.C. (2003). Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH2-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J Gen. Physiol* 122, 333-348.

Batagov,A.O., Kuznetsov,V.A., and Kurochkin,I.V. (2011). Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC. Genomics* 12 Suppl 3, S18.

Bebawy,M., Combes,V., Lee,E., Jaiswal,R., Gong,J., Bonhoure,A., and Grau,G.E. (2009). Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia* 23, 1643-1649.

Bellon,G., Michel-Calemard,L., Thouvenot,D., Jagneaux,V., Poitevin,F., Malcus,C., Accart,N., Layani,M.P., Aymard,M., Bernon,H., Bienvenu,J., Courtney,M., Doring,G., Gilly,B., Gilly,R., Lamy,D., Levrey,H., Morel,Y., Paulin,C., Perraud,F., Rodillon,L., Sene,C., So,S., Touraine-Moulin,F., Pavirani,A., and . (1997). Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 8, 15-25.

Benderra,Z., Faussat,A.M., Sayada,L., Perrot,J.Y., Chaoui,D., Marie,J.P., and Legrand,O. (2004). Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res.* 10, 7896-7902.

Berger,H.A., Anderson,M.P., Gregory,R.J., Thompson,S., Howard,P.W., Maurer,R.A., Mulligan,R., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1991). Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J. Clin Invest* 88, 1422-1431.

Berger,H.A., Travis,S.M., and Welsh,M.J. (1993). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 268, 2037-2047.

Biemans-Oldehinkel,E., Doeven,M.K., and Poolman,B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* 580, 1023-1035.

Bryan E.Strauss and Eugenia,C. (2013). *Gene Therapy for Melanoma: Progress and Perspectives.*, p. 293.

Burger,D., Schock,S., Thompson,C.S., Montezano,A.C., Hakim,A.M., and Touyz,R.M. (2013). Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)* 124, 423-441.

Busch,R. (1990). On the history of cystic fibrosis. *Acta Univ Carol. Med (Praha)* 36, 13-15.

Buschow,S.I., Nolte-'t Hoen,E.N., van,N.G., Pols,M.S., ten,B.T., Lauwen,M., Ossendorp,F., Melief,C.J., Raposo,G., Wubbolts,R., Wauben,M.H., and Stoorvogel,W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic.* 10, 1528-1542.

- Caplen,N.J., Alton,E.W., Middleton,P.G., Dorin,J.R., Stevenson,B.J., Gao,X., Durham,S.R., Jeffery,P.K., Hodson,M.E., Coutelle,C., and . (1995). Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med* 1, 39-46.
- Cheng,S.H., Gregory,R.J., Marshall,J., Paul,S., Souza,D.W., White,G.A., O'Riordan,C.R., and Smith,A.E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827-834.
- Childers,M., Eckel,G., Himmel,A., and Caldwell,J. (2007). A new model of cystic fibrosis pathology: lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. *Med. Hypotheses* 68, 101-112.
- Clayton,A., Mitchell,J.P., Court,J., Mason,M.D., and Tabi,Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 67, 7458-7466.
- Coclet-Ninin,J., Rochat,T., Poitry,S., and Chanson,M. (2002). Discrimination between cystic fibrosis and CFTR-corrected epithelial cells by a membrane potential-sensitive probe. *Exp. Lung Res.* 28, 181-199.
- Cohn,J.A., Friedman,K.J., Noone,P.G., Knowles,M.R., Silverman,L.M., and Jowell,P.S. (1998). Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N. Engl. J. Med.* 339, 653-658.
- Colas,J., Faure,G., Sausseureau,E., Trudel,S., Rabeh,W.M., Bitam,S., Guerrera,I.C., Fritsch,J., Sermet-Gaudelus,I., Davezac,N., Brouillard,F., Lukacs,G.L., Herrmann,H., Ollero,M., and Edelman,A. (2012). Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect. *Hum. Mol. Genet* 21, 623-634.
- Colombo,M., Moita,C., van,N.G., Kowal,J., Vigneron,J., Benaroch,P., Manel,N., Moita,L.F., Thery,C., and Raposo,G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126, 5553-5565.
- Colombo,M., Raposo,G., and Thery,C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255-289.
- Conner,G.E., Wijkstrom-Frei,C., Randell,S.H., Fernandez,V.E., and Salathe,M. (2007). The lactoperoxidase system links anion transport to host defense in cystic fibrosis. *FEBS Lett.* 581, 271-278.
- Corjon,S., Gonzalez,G., Henning,P., Grichine,A., Lindholm,L., Boulanger,P., Fender,P., and Hong,S.S. (2011). Cell entry and trafficking of human adenovirus bound to blood factor X is determined by the fiber serotype and not hexon:heparan sulfate interaction. *PLoS. One.* 6, e18205.
- Cotten,J.F. and Welsh,M.J. (1997). Covalent modification of the regulatory domain irreversibly stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 272, 25617-25622.
- Crescitelli,R., Lasser,C., Szabo,T.G., Kittel,A., Eldh,M., Dianzani,I., Buzas,E.I., and Lotvall,J. (2013). Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell. Vesicles.* 2.
- Crystal,R.G., McElvaney,N.G., Rosenfeld,M.A., Chu,C.S., Mastrangeli,A., Hay,J.G., Brody,S.L., Jaffe,H.A., Eissa,N.T., and Danel,C. (1994). Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet* 8, 42-51.
- D'Herelle,F. (2007). On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res. Microbiol.* 158, 553-554.

- Dahan,D., Evagelidis,A., Hanrahan,J.W., Hinkson,D.A., Jia,Y., Luo,J., and Zhu,T. (2001). Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. *Pflugers Arch* 443 Suppl 1, S92-S96.
- Dalton,A.J. (1975). Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus "virus-like" particles. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 1137-1148.
- Dalton,J., Kalid,O., Schushan,M., Ben-Tal,N., and Villa-Freixa,J. (2012). New model of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator proposes active channel-like conformation. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 1842-1853.
- Danzer,K.M., Kranich,L.R., Ruf,W.P., Cagsal-Getkin,O., Winslow,A.R., Zhu,L., Vanderburg,C.R., and McLean,P.J. (2012). Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol. Neurodegener.* 7, 42.
- Davezac,N., Tondelier,D., Lipecka,J., Fanen,P., Demaugre,F., Debski,J., Dadlez,M., Schrattenholz,A., Cahill,M.A., and Edelman,A. (2004). Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane. *Proteomics.* 4, 3833-3844.
- De,T.J., Herschlik,L., Waldner,C., and Mongini,C. (2015). Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front Immunol.* 6, 203.
- Dean,M., Hamon,Y., and Chimini,G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* 42, 1007-1017.
- Debarbieux,L., Leduc,D., Maura,D., Morello,E., Criscuolo,A., Grossi,O., Balloy,V., and Touqui,L. (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect. Dis.* 201, 1096-1104.
- Deregibus,M.C., Tetta,C., and Camussi,G. (2010). The dynamic stem cell microenvironment is orchestrated by microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Histol. Histopathol.* 25, 397-404.
- Di Sant'Agnese,P.A., Darling,R.C., Perera,G.A., and Shea,E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12, 549-563.
- Engelhardt,J.F., Yankaskas,J.R., Ernst,S.A., Yang,Y., Marino,C.R., Boucher,R.C., Cohn,J.A., and Wilson,J.M. (1992). Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat. Genet* 2, 240-248.
- Escrevente,C., Keller,S., Altevogt,P., and Costa,J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC. Cancer* 11, 108.
- Escudier,B., Dorval,T., Chaput,N., Andre,F., Caby,M.P., Novault,S., Flament,C., Leboulaire,C., Borg,C., Amigorena,S., Boccaccio,C., Bonnerot,C., Dhellin,O., Movassagh,M., Piperno,S., Robert,C., Serra,V., Valente,N., Le Pecq,J.B., Spatz,A., Lantz,O., Tursz,T., Angevin,E., and Zitvogel,L. (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl. Med* 3, 10.
- Farber,S. (1943). Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. *N Engl J Med* 653-682.

- Farinha,C.M., Nogueira,P., Mendes,F., Penque,D., and Amaral,M.D. (2002). The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem. J.* 366, 797-806.
- Farmen,S.L., Karp,P.H., Ng,P., Palmer,D.J., Koehler,D.R., Hu,J., Beaudet,A.L., Zabner,J., and Welsh,M.J. (2005). Gene transfer of CFTR to airway epithelia: low levels of expression are sufficient to correct Cl-transport and overexpression can generate basolateral CFTR. *Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 289, L1123-L1130.
- Fevrier,B., Vilette,D., Archer,F., Loew,D., Faigle,W., Vidal,M., Laude,H., and Raposo,G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9683-9688.
- Fruhbeis,C., Frohlich,D., Kuo,W.P., and Kramer-Albers,E.M. (2013). Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci.* 7, 182.
- Fu,L. and Sztul,E. (2009). ER-associated complexes (ERACs) containing aggregated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) are degraded by autophagy. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 215-226.
- Gabriel,S.E., Clarke,L.L., Boucher,R.C., and Stutts,M.J. (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363, 263-268.
- Gallati,S. (2014). Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet* 7, 133-146.
- Geminard,C., De,G.A., Blanc,L., and Vidal,M. (2004). Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic.* 5, 181-193.
- George,A.M. and Jones,P.M. (2012). Perspectives on the structure-function of ABC transporters: the Switch and Constant Contact models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 109, 95-107.
- Ghossoub,R., Lembo,F., Rubio,A., Gaillard,C.B., Bouchet,J., Vitale,N., Slavik,J., Machala,M., and Zimmermann,P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat. Commun.* 5, 3477.
- Gibson,L.E. and Cooke,R.E. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23, 545-549.
- Gill,D.R. and Hyde,S.C. (2014). Delivery of genes into the CF airway. *Thorax* 69, 962-964.
- Ginestra,A., La Placa,M.D., Saladino,F., Cassara,D., Nagase,H., and Vittorelli,M.L. (1998). The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res.* 18, 3433-3437.
- Gonzalez,G., Vituret,C., Di Pietro,A., Chanson,M., Boulanger,P., and Hong,S.S. (2012). Microparticle-mediated transfer of the viral receptors CAR and CD46, and the CFTR channel in a CHO cell model confers new functions to target cells. *PLoS. One.* 7, e52326.
- Granio,O., Ashbourne Excoffon,K.J., Henning,P., Melin,P., Norez,C., Gonzalez,G., Karp,P.H., Magnusson,M.K., Habib,N., Lindholm,L., Becq,F., Boulanger,P., Zabner,J., and Hong,S.S. (2010). Adenovirus 5-fiber 35 chimeric vector mediates efficient apical correction of the cystic fibrosis

transmembrane conductance regulator defect in cystic fibrosis primary airway epithelia. *Hum. Gene Ther.* 21, 251-269.

Granio,O., Norez,C., Ashbourne Excoffon,K.J., Karp,P.H., Lusky,M., Becq,F., Boulanger,P., Zabner,J., and Hong,S.S. (2007). Cellular localization and activity of Ad-delivered GFP-CFTR in airway epithelial and tracheal cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37, 631-639.

Gyorgy,B., Hung,M.E., Breakefield,X.O., and Leonard,J.N. (2015). Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 55, 439-464.

Gyorgy,B., Szabo,T.G., Pasztoi,M., Pal,Z., Misjak,P., Aradi,B., Laszlo,V., Pallinger,E., Pap,E., Kittel,A., Nagy,G., Falus,A., and Buzas,E.I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol. Life Sci* 68, 2667-2688.

Haardt,M., Benharouga,M., Lechardeur,D., Kartner,N., and Lukacs,G.L. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol. Chem.* 274, 21873-21877.

Harding,C., Heuser,J., and Stahl,P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329-339.

Harris,A. (1992). Cystic fibrosis gene. *Br. Med. Bull.* 48, 738-753.

Harvey,B.G., Leopold,P.L., Hackett,N.R., Grasso,T.M., Williams,P.M., Tucker,A.L., Kaner,R.J., Ferris,B., Gonda,I., Sweeney,T.D., Ramalingam,R., Kovesdi,I., Shak,S., and Crystal,R.G. (1999). Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 104, 1245-1255.

Hautes Autorités de Santé. Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : État des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement. Etat des lieux en santé publique . 2009.
Ref Type: Journal (Full)

Hegedus T,G.M.a.R.J. (2011). *CFTR: Understanding the cause and influencing the outcome of a major genetic disease.* In *The ABC transporters of human physiology and disease.*, H.B.Linton K, ed. *World Scientific Publishing*), pp. 269-309.

Higgins,C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.

Higgins,C.F., Gallagher,M.P., Mimmack,M.L., and Pearce,S.R. (1988). A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays* 8, 111-116.

Hobbs,C.A., Da,T.C., and Tarran,R. (2013). Does epithelial sodium channel hyperactivity contribute to cystic fibrosis lung disease? *J Physiol* 591, 4377-4387.

Hoiby,N., Ciofu,O., Johansen,H.K., Song,Z.J., Moser,C., Jensen,P.O., Molin,S., Givskov,M., Tolker-Nielsen,T., and Bjarnsholt,T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J Oral Sci* 3, 55-65.

Hugel,B., Martinez,M.C., Kunzelmann,C., and Freyssinet,J.M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology. (Bethesda.)* 20, 22-27.

Hunt,J.F., Wang,C., and Ford,R.C. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7) structure. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a009514.

Hyde,S.C., Southern,K.W., Gileadi,U., Fitzjohn,E.M., Mofford,K.A., Waddell,B.E., Gooi,H.C., Goddard,C.A., Hannavy,K., Smyth,S.E., Egan,J.J., Sorgi,F.L., Huang,L., Cuthbert,A.W., Evans,M.J., Colledge,W.H., Higgins,C.F., Webb,A.K., and Gill,D.R. (2000). Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther.* 7, 1156-1165.

Ikonen,E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 470-477.

Jefferson,D.M., Valentich,J.D., Marini,F.C., Grubman,S.A., Iannuzzi,M.C., Dorkin,H.L., Li,M., Klinger,K.W., and Welsh,M.J. (1990). Expression of normal and cystic fibrosis phenotypes by continuous airway epithelial cell lines. *Am. J. Physiol* 259, L496-L505.

Jensen,T.J., Loo,M.A., Pind,S., Williams,D.B., Goldberg,A.L., and Riordan,J.R. (1995). Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83, 129-135.

Jia,Y., Mathews,C.J., and Hanrahan,J.W. (1997). Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 272, 4978-4984.

Johnson,L.G., Olsen,J.C., Sarkadi,B., Moore,K.L., Swanstrom,R., and Boucher,R.C. (1992). Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat. Genet* 2, 21-25.

Jones,P.M. and George,A.M. (2009). Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle. *Proteins* 75, 387-396.

Jovov,B., Ismailov,I.I., Berdiev,B.K., Fuller,C.M., Sorscher,E.J., Dedman,J.R., Kaetzel,M.A., and Benos,D.J. (1995). Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J. Biol. Chem.* 270, 29194-29200.

Kalra,H., Simpson,R.J., Ji,H., Aikawa,E., Altevogt,P., Askenase,P., Bond,V.C., Borrás,F.E., Breakefield,X., Budnik,V., Buzas,E., Camussi,G., Clayton,A., Cocucci,E., Falcon-Perez,J.M., Gabrielsson,S., Gho,Y.S., Gupta,D., Harsha,H.C., Hendrix,A., Hill,A.F., Inal,J.M., Jenster,G., Kramer-Albers,E.M., Lim,S.K., Llorente,A., Lotvall,J., Marcilla,A., Mincheva-Nilsson,L., Nazarenko,I., Nieuwland,R., Nolte-'t Hoen,E.N., Pandey,A., Patel,T., Piper,M.G., Pluchino,S., Prasad,T.S., Rajendran,L., Raposo,G., Record,M., Reid,G.E., Sanchez-Madrid,F., Schiffelers,R.M., Siljander,P., Stensballe,A., Stoorvogel,W., Taylor,D., Thery,C., Valadi,H., Van Balkom,B.W., Vazquez,J., Vidal,M., Wauben,M.H., Yanez-Mo,M., Zoeller,M., and Mathivanan,S. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS. Biol.* 10, e1001450.

Kanelis,V., Hudson,R.P., Thibodeau,P.H., Thomas,P.J., and Forman-Kay,J.D. (2010). NMR evidence for differential phosphorylation-dependent interactions in WT and DeltaF508 CFTR. *EMBO J* 29, 263-277.

Katsuda,T., Kosaka,N., Takeshita,F., and Ochiya,T. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics.* 13, 1637-1653.

Kavishe,R.A., van den Heuvel,J.M., van,d., V, Luty,A.J., Russel,F.G., and Koenderink,J.B. (2009). Localization of the ATP-binding cassette (ABC) transport proteins PfMRP1, PfMRP2, and PfMDR5 at the Plasmodium falciparum plasma membrane. *Malar. J.* 8, 205.

Keller,S., Sanderson,M.P., Stoeck,A., and Altevogt,P. (2006). Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* 107, 102-108.

- Kerem,B., Rommens,J.M., Buchanan,J.A., Markiewicz,D., Cox,T.K., Chakravarti,A., Buchwald,M., and Tsui,L.C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-1080.
- Kerem,E., Konstan,M.W., De,B.K., Accurso,F.J., Sermet-Gaudelus,I., Wilschanski,M., Elborn,J.S., Melotti,P., Bronsveld,I., Fajac,I., Malfroot,A., Rosenbluth,D.B., Walker,P.A., McColley,S.A., Knoop,C., Quattrucci,S., Rietschel,E., Zeitlin,P.L., Barth,J., Elfring,G.L., Welch,E.M., Branstrom,A., Spiegel,R.J., Peltz,S.W., Ajayi,T., and Rowe,S.M. (2014). Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir. Med* 2, 539-547.
- Kesimer,M., Scull,M., Brighton,B., DeMaria,G., Burns,K., O'Neal,W., Pickles,R.J., and Sheehan,J.K. (2009). Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 23, 1858-1868.
- Kim,S.J. and Skach,W.R. (2012). Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Front Pharmacol* 3, 201.
- Knowles,M., Gatz,J., and Boucher,R. (1981). Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 305, 1489-1495.
- Knowles,M.R., Stutts,M.J., Spock,A., Fischer,N., Gatz,J.T., and Boucher,R.C. (1983). Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221, 1067-1070.
- Konstas,A.A., Koch,J.P., Tucker,S.J., and Korbmacher,C. (2002). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K⁺ channels by the epithelial sodium channel. *J Biol. Chem.* 277, 25377-25384.
- Krishnamurthy,P. and Schuetz,J.D. (2011). The role of ABCG2 and ABCB6 in porphyrin metabolism and cell survival. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 647-655.
- Kuchler,K. (2011). The ABC of ABCs: multidrug resistance and genetic diseases. *FEBS J.* 278, 3189.
- Kunzelmann,K. (2001). CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci* 16, 167-170.
- Laulagnier,K., Grand,D., Dujardin,A., Hamdi,S., Vincent-Schneider,H., Lankar,D., Salles,J.P., Bonnerot,C., Perret,B., and Record,M. (2004). PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS Lett.* 572, 11-14.
- Le Gall,T., Berchel,M., Le,H.S., Fraix,A., Salaun,J.Y., Ferec,C., Lehn,P., Jaffres,P.A., and Montier,T. (2013). Arsonium-containing lipophosphoramides, poly-functional nano-carriers for simultaneous antibacterial action and eukaryotic cell transfection. *Adv. Healthc. Mater.* 2, 1513-1524.
- Lee,C.M., Flynn,R., Hollywood,J.A., Scallan,M.F., and Harrison,P.T. (2012). Correction of the DeltaF508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair. *Biores. Open. Access.* 1, 99-108.
- Leroyer,A.S., Anfosso,F., Lacroix,R., Sabatier,F., Simoncini,S., Njock,S.M., Jourde,N., Brunet,P., Camoin-Jau,L., Sampol,J., and Dignat-George,F. (2010). Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 104, 456-463.
- Linsdell,P., Tabcharani,J.A., Rommens,J.M., Hou,Y.X., Chang,X.B., Tsui,L.C., Riordan,J.R., and Hanrahan,J.W. (1997). Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J. Gen. Physiol* 110, 355-364.

- Linton,K.J. (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology*. (Bethesda.) 22, 122-130.
- Loo,M.A., Jensen,T.J., Cui,L., Hou,Y., Chang,X.B., and Riordan,J.R. (1998). Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J.* 17, 6879-6887.
- Lugini,L., Cecchetti,S., Huber,V., Luciani,F., Macchia,G., Spadaro,F., Paris,L., Abalsamo,L., Colone,M., Molinari,A., Podo,F., Rivoltini,L., Ramoni,C., and Fais,S. (2012). Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J Immunol.* 189, 2833-2842.
- Lukacs,G.L., Chang,X.B., Bear,C., Kartner,N., Mohamed,A., Riordan,J.R., and Grinstein,S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J. Biol. Chem.* 268, 21592-21598.
- Luo,J., Pato,M.D., Riordan,J.R., and Hanrahan,J.W. (1998). Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am. J. Physiol* 274, C1397-C1410.
- Madry,E., Fidler,E., Sobczynska-Tomaszewska,A., Lisowska,A., Krzyzanowska,P., Pogorzelski,A., Minarowski,L., Oralewska,B., Mojs,E., Sapiejka,E., Marciniak,R., Sands,D., Korzon-Burakowska,A., Kwiecien,J., and Walkowiak,J. (2011). Mild CFTR mutations and genetic predisposition to lactase persistence in cystic fibrosis. *Eur. J Hum. Genet* 19, 748-752.
- Mangeot,P.E., Dollet,S., Girard,M., Cancia,C., Joly,S., Peschanski,M., and Lotteau,V. (2011). Protein transfer into human cells by VSV-G-induced nanovesicles. *Mol. Ther.* 19, 1656-1666.
- Manno,S., Takakuwa,Y., and Mohandas,N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1943-1948.
- Martini,S.V., Rocco,P.R., and Morales,M.M. (2011). Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Braz. J Med Biol. Res.* 44, 1097-1104.
- Mathias,P., Wickham,T., Moore,M., and Nemerow,G. (1994). Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol.* 68, 6811-6814.
- Mathivanan,S., Ji,H., and Simpson,R.J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 73, 1907-1920.
- Mathivanan,S. and Simpson,R.J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics.* 9, 4997-5000.
- Miranda,K.C., Bond,D.T., McKee,M., Skog,J., Paunescu,T.G., Da,S.N., Brown,D., and Russo,L.M. (2010). Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* 78, 191-199.
- Modiano,G., Ciminelli,B.M., and Pignatti,P.F. (2007). Cystic fibrosis and lactase persistence: a possible correlation. *Eur. J Hum. Genet* 15, 255-259.
- Montecalvo,A., Larregina,A.T., Shufesky,W.J., Stolz,D.B., Sullivan,M.L., Karlsson,J.M., Baty,C.J., Gibson,G.A., Erdos,G., Wang,Z., Milosevic,J., Tkacheva,O.A., Divito,S.J., Jordan,R., Lyons-Weiler,J., Watkins,S.C., and Morelli,A.E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756-766.

- Morelli,A.E., Larregina,A.T., Shufesky,W.J., Sullivan,M.L., Stolz,D.B., Papworth,G.D., Zahorchak,A.F., Logar,A.J., Wang,Z., Watkins,S.C., Falo,L.D., Jr., and Thomson,A.W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257-3266.
- Morello,E., Sausseureau,E., Maura,D., Huerre,M., Touqui,L., and Debarbieux,L. (2011). Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS. One.* 6, e16963.
- Mornon,J.P., Lehn,P., and Callebaut,I. (2008). Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell Mol. Life Sci* 65, 2594-2612.
- Morse,M.A., Garst,J., Osada,T., Khan,S., Hobeika,A., Clay,T.M., Valente,N., Shreeniwas,R., Sutton,M.A., Delcayre,A., Hsu,D.H., Le Pecq,J.B., and Lysterly,H.K. (2005). A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl. Med* 3, 9.
- Moskwa,P., Lorentzen,D., Excoffon,K.J., Zabner,J., McCray,P.B., Jr., Nauseef,W.M., Dupuy,C., and Banfi,B. (2007). A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 175, 174-183.
- Mosser,J., Douar,A.M., Sarde,C.O., Kioschis,P., Feil,R., Moser,H., Poustka,A.M., Mandel,J.L., and Aubourg,P. (1993). Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361, 726-730.
- Moyer,B.D., Duhaime,M., Shaw,C., Denton,J., Reynolds,D., Karlson,K.H., Pfeiffer,J., Wang,S., Mickle,J.E., Milewski,M., Cutting,G.R., Guggino,W.B., Li,M., and Stanton,B.A. (2000). The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 27069-27074.
- Mulcahy,L.A., Pink,R.C., and Carter,D.R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell. Vesicles.* 3.
- Naslund,T.I., Paquin-Proulx,D., Paredes,P.T., Vallhov,H., Sandberg,J.K., and Gabrielsson,S. (2014). Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS* 28, 171-180.
- Ni,Z., Bikadi,Z., Rosenberg,M.F., and Mao,Q. (2010). Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr. Drug Metab* 11, 603-617.
- Nolan,J.P. (2015). Flow Cytometry of Extracellular Vesicles: Potential, Pitfalls, and Prospects. *Curr. Protoc. Cytom.* 73, 13.
- Norez,C., Antigny,F., Noel,S., Vandebrouck,C., and Becq,F. (2009). A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 217-225.
- Odolczyk,N., Fritsch,J., Norez,C., Serval,N., da Cunha,M.F., Bitam,S., Kupniewska,A., Wiszniewski,L., Colas,J., Tarnowski,K., Tondelier,D., Roldan,A., Sausseureau,E.L., Melin-Heschel,P., Wiczorek,G., Lukacs,G.L., Dadlez,M., Faure,G., Herrmann,H., Ollero,M., Becq,F., Zielenkiewicz,P., and Edelman,A. (2013). Discovery of novel potent DeltaF508-CFTR correctors that target the nucleotide binding domain. *EMBO Mol. Med* 5, 1484-1501.

- Ostrowski,M., Carmo,N.B., Krumeich,S., Fanget,I., Raposo,G., Savina,A., Moita,C.F., Schauer,K., Hume,A.N., Freitas,R.P., Goud,B., Benaroch,P., Hacohen,N., Fukuda,M., Desnos,C., Seabra,M.C., Darchen,F., Amigorena,S., Moita,L.F., and Thery,C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19-30.
- Pan,B.T. and Johnstone,R.M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967-978.
- Perricone,M.A., Morris,J.E., Pavelka,K., Plog,M.S., O'Sullivan,B.P., Joseph,P.M., Dorkin,H., Lapey,A., Balfour,R., Meeker,D.P., Smith,A.E., Wadsworth,S.C., and St George,J.A. (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium. *Hum. Gene Ther.* 12, 1383-1394.
- Pier,G.B., Grout,M., Zaidi,T., Meluleni,G., Mueschenborn,S.S., Banting,G., Ratcliff,R., Evans,M.J., and Colledge,W.H. (1998). Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393, 79-82.
- Pind,S., Riordan,J.R., and Williams,D.B. (1994). Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 269, 12784-12788.
- Pitt,J.M., Charrier,M., Viaud,S., Andre,F., Besse,B., Chaput,N., and Zitvogel,L. (2014). Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol.* 193, 1006-1011.
- Poolman,E.M. and Galvani,A.P. (2007). Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *J R. Soc. Interface* 4, 91-98.
- Prickett,M. and Jain,M. (2013). Gene therapy in cystic fibrosis. *Transl. Res.* 161, 255-264.
- Prince,L.S., Workman,R.B., Jr., and Marchase,R.B. (1994). Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5192-5196.
- Procko,E., O'Mara,M.L., Bennett,W.F., Tieleman,D.P., and Gaudet,R. (2009). The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *FASEB J.* 23, 1287-1302.
- Quintana-Gallego,E., Delgado-Pecellin,I., and Calero,A.C. (2014). CFTR protein repair therapy in cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol.* 50, 146-150.
- Quinton,P.M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301, 421-422.
- Quinton,P.M. (1999). Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* 79, S3-S22.
- Rahman,K.S., Cui,G., Harvey,S.C., and McCarty,N.A. (2013). Modeling the conformational changes underlying channel opening in CFTR. *PLoS. One.* 8, e74574.
- Raiborg,C. and Stenmark,H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452.
- Ramsey,B.W., Davies,J., McElvaney,N.G., Tullis,E., Bell,S.C., Drevinek,P., Griese,M., McKone,E.F., Wainwright,C.E., Konstan,M.W., Moss,R., Ratjen,F., Sermet-Gaudelus,I., Rowe,S.M., Dong,Q.,

- Rodriguez,S., Yen,K., Ordonez,C., and Elborn,J.S. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 365, 1663-1672.
- Raposo,G., Nijman,H.W., Stoorvogel,W., Liejendekker,R., Harding,C.V., Melief,C.J., and Geuze,H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp. Med* 183, 1161-1172.
- Raposo,G. and Stoorvogel,W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 200, 373-383.
- Ratajczak,J., Miekus,K., Kucia,M., Zhang,J., Reca,R., Dvorak,P., and Ratajczak,M.Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20, 847-856.
- Reddy,M.M., Light,M.J., and Quinton,P.M. (1999). Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature* 402, 301-304.
- Reeves,E.P., Molloy,K., Pohl,K., and McElvaney,N.G. (2012). Hypertonic saline in treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *ScientificWorldJournal*. 2012, 465230.
- Ren,H.Y., Grove,D.E., De La Rosa,O., Houck,S.A., Sopha,P., Van,G.F., Hoffman,B.J., and Cyr,D.M. (2013). VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol. Biol. Cell* 24, 3016-3024.
- Riordan,J.R., Rommens,J.M., Kerem,B., Alon,N., Rozmahel,R., Grzelczak,Z., Zielenski,J., Lok,S., Plavsic,N., Chou,J.L., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
- Rogan,M.P., Taggart,C.C., Greene,C.M., Murphy,P.G., O'Neill,S.J., and McElvaney,N.G. (2004). Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect. Dis.* 190, 1245-1253.
- Rommens,J.M., Iannuzzi,M.C., Kerem,B., Drumm,M.L., Melmer,G., Dean,M., Rozmahel,R., Cole,J.L., Kennedy,D., Hidaka,N., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059-1065.
- Roucourt,B., Meeussen,S., Bao,J., Zimmermann,P., and David,G. (2015). Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Res.* 25, 412-428.
- Ruiz,F.E., Clancy,J.P., Perricone,M.A., Bebok,Z., Hong,J.S., Cheng,S.H., Meeker,D.P., Young,K.R., Schoumacher,R.A., Weatherly,M.R., Wing,L., Morris,J.E., Sindel,L., Rosenberg,M., van Ginkel,F.W., McGhee,J.R., Kelly,D., Lyrene,R.K., and Sorscher,E.J. (2001). A clinical inflammatory syndrome attributable to aerosolized lipid-DNA administration in cystic fibrosis. *Hum. Gene Ther.* 12, 751-761.
- Russell,W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen. Virol.* 81, 2573-2604.
- Scanu,A., Molnarfi,N., Brandt,K.J., Gruaz,L., Dayer,J.M., and Burger,D. (2008). Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J Leukoc. Biol.* 83, 921-927.
- Schneider,E. and Hunke,S. (1998). ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 1-20.

- Senior, A.E. and Bhagat, S. (1998). P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry* 37, 831-836.
- Sermet-Gaudelus, I., Renouil, M., Fajac, A., Bidou, L., Parbaille, B., Pierrot, S., Davy, N., Bismuth, E., Reinert, P., Lenoir, G., Lesure, J.F., Rousset, J.P., and Edelman, A. (2007). In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC. Med* 5, 5.
- Serohijos, A.W.R., Hegedus, T., Aleksandrov, A.A., He, L., Cui, L., Dokholyan, N.V., and Riordan, J.R. (2008). Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3256-3261.
- Shang, J. and Gao, X. (2014). Nanoparticle counting: towards accurate determination of the molar concentration. *Chem. Soc. Rev.* 43, 7267-7278.
- Sharma, G., Burke, J., Bhattacharyya, S., Sharma, N., Katyal, S., Park, R.L., and Tobacman, J. (2013). Reduced Arylsulfatase B activity in leukocytes from cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* 48, 236-244.
- Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., Benharouga, M., So, J., Du, K., Bache, K.G., Papsin, B., Zerangue, N., Stenmark, H., and Lukacs, G.L. (2004). Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol.* 164, 923-933.
- Shen, B.Q., Finkbeiner, W.E., Wine, J.J., Mrsny, R.J., and Widdicombe, J.H. (1994). Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *Am. J. Physiol* 266, L493-L501.
- Simon, M. Pineau S. Caillon J. Dufour A. Bazire A. Effect of an antibiofilm extract of the culture supernatant of *Pseudoalteromonas* 3J6. 7th European CF Young Investigator Meeting . 2012.
Ref Type: Conference Proceeding
- Singh, R. and Kostarelos, K. (2009). Designer adenoviruses for nanomedicine and nanodiagnostics. *Trends Biotechnol.* 27, 220-229.
- Sinn, P.L., Burnight, E.R., Hickey, M.A., Blissard, G.W., and McCray, P.J. (2005). Persistent gene expression in mouse nasal epithelia following feline immunodeficiency virus-based vector gene transfer. *J Virol* 79, 12818-12827.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (2002). ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* 10, 139-149.
- Steinfels, E., Orelle, C., Fantino, J.R., Dalmás, O., Rigaud, J.L., Denizot, F., Di Pietro, A., and Jault, J.M. (2004). Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 43, 7491-7502.
- Stolarczyk, E.I., Reiling, C.J., and Paumi, C.M. (2011). Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 621-635.
- Stuffers, S., Sem, W.C., Stenmark, H., and Brech, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic.* 10, 925-937.
- Tabcharani, J.A., Chang, X.B., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (1991). Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352, 628-631.

- Taraboletti,G., D'Ascenzo,S., Giusti,I., Marchetti,D., Borsotti,P., Millimaggi,D., Giavazzi,R., Pavan,A., and Dolo,V. (2006). Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia*. 8, 96-103.
- Thomas,P.M., Cote,G.J., Wohllk,N., Haddad,B., Mathew,P.M., Rabl,W., Aguilar-Bryan,L., Gagel,R.F., and Bryan,J. (1995). Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268, 426-429.
- Trajkovic,K., Hsu,C., Chiantia,S., Rajendran,L., Wenzel,D., Wieland,F., Schwille,P., Brugger,B., and Simons,M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319, 1244-1247.
- Trams,E.G., Lauter,C.J., Salem,N., Jr., and Heine,U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 645, 63-70.
- Trotman,L.C., Mosberger,N., Fornerod,M., Stidwill,R.P., and Greber,U.F. (2001). Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell Biol.* 3, 1092-1100.
- Turturici,G., Tinnirello,R., Sconzo,G., and Geraci,F. (2014). Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am. J Physiol Cell Physiol* 306, C621-C633.
- Valdameri,G., Pereira,R.L., Spatafora,C., Guitton,J., Gauthier,C., Arnaud,O., Ferreira-Pereira,A., Falson,P., Winnischofer,S.M., Rocha,M.E., Tringali,C., and Di Pietro,A. (2012). Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein. *ACS Chem. Biol.* 7, 322-330.
- Varga,K., Jurkuvenaite,A., Wakefield,J., Hong,J.S., Guimbellot,J.S., Venglarik,C.J., Niraj,A., Mazur,M., Sorscher,E.J., Collawn,J.F., and Bebok,Z. (2004). Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J Biol. Chem.* 279, 22578-22584.
- Vergani,P., Lockless,S.W., Nairn,A.C., and Gadsby,D.C. (2005). CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433, 876-880.
- Vilette,D., Laulagnier,K., Huor,A., Alais,S., Simoes,S., Maryse,R., Provansal,M., Lehmann,S., Andreoletti,O., Schaeffer,L., Raposo,G., and Leblanc,P. (2015). Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell Mol. Life Sci.*
- Villarroya-Beltri,C., Gutierrez-Vazquez,C., Sanchez-Cabo,F., Perez-Hernandez,D., Vazquez,J., Martin-Cofreces,N., Martinez-Herrera,D.J., Pascual-Montano,A., Mittelbrunn,M., and Sanchez-Madrid,F. (2013). Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* 4, 2980.
- Wainwright,C.E., Elborn,J.S., Ramsey,B.W., Marigowda,G., Huang,X., Cipolli,M., Colombo,C., Davies,J.C., De,B.K., Flume,P.A., Konstan,M.W., McColley,S.A., McCoy,K., McKone,E.F., Munck,A., Ratjen,F., Rowe,S.M., Waltz,D., and Boyle,M.P. (2015). Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*.
- Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J., and Gay,N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945-951.

Webber,J. and Clayton,A. (2013). How pure are your vesicles? *J Extracell. Vesicles*. 2.

Welch,E.M., Barton,E.R., Zhuo,J., Tomizawa,Y., Friesen,W.J., Trifillis,P., Paushkin,S., Patel,M., Trotta,C.R., Hwang,S., Wilde,R.G., Karp,G., Takasugi,J., Chen,G., Jones,S., Ren,H., Moon,Y.C., Corson,D., Turpoff,A.A., Campbell,J.A., Conn,M.M., Khan,A., Almstead,N.G., Hedrick,J., Mollin,A., Risher,N., Weetall,M., Yeh,S., Branstrom,A.A., Colacino,J.M., Babiak,J., Ju,W.D., Hirawat,S., Northcutt,V.J., Miller,L.L., Spatrick,P., He,F., Kawana,M., Feng,H., Jacobson,A., Peltz,S.W., and Sweeney,H.L. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87-91.

Wine,J.J. (1999). The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 103, 309-312.

Wolf,P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J Haematol*. 13, 269-288.

Wolfers,J., Lozier,A., Raposo,G., Regnault,A., Thery,C., Masurier,C., Flament,C., Pouzieux,S., Faure,F., Tursz,T., Angevin,E., Amigorena,S., and Zitvogel,L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med* 7, 297-303.

Yang,Y., Janich,S., Cohn,J.A., and Wilson,J.M. (1993). The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9480-9484.

Zabner,J., Couture,L.A., Gregory,R.J., Graham,S.M., Smith,A.E., and Welsh,M.J. (1993). Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75, 207-216.

Zhang,B., Yin,Y., Lai,R.C., and Lim,S.K. (2014). Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol*. 5, 518.

Zitvogel,L., Regnault,A., Lozier,A., Wolfers,J., Flament,C., Tenza,D., Ricciardi-Castagnoli,P., Raposo,G., and Amigorena,S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med* 4, 594-600.

Zvereff,V.V., Faruki,H., Edwards,M., and Friedman,K.J. (2014). Cystic fibrosis carrier screening in a North American population. *Genet Med* 16, 539-546.

Zwaal,R.F., Comfurius,P., and Bevers,E.M. (2005). Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol. Life Sci* 62, 971-988.

RESUME

La mucoviscidose est une maladie génétique due à des mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), conduisant à un défaut d'adressage de la protéine CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales, ou à un déficit de sa fonction de canal à ions chlorure. Ce travail a consisté à étudier les vésicules extracellulaires (EV), microvésicules (MV) et exosomes (Exo), comme vecteurs de la protéine CFTR et de son ARN messager. La preuve de concept du transfert de matériel biologique d'intérêt par l'intermédiaire d'EV, d'abord apportée sur un modèle de cellules animales (CHO), a été validée en cellules humaines. Les EV ont été isolées à partir de surnageant de Calu-3, cellules exprimant la protéine CFTR de manière endogène, et de A549 transduites par le vecteur adénoviral Ad5-GFP-CFTR, surexprimant la protéine de fusion GFP-CFTR. Les cellules cibles choisies, A549 et CF15, étaient déficientes en CFTR. Le transfert s'est révélé plus efficace en système homologue (A549/A549) qu'en système hétérologue (A549/CF15). Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques suggère que les EV ne suivent pas une voie d'internalisation cellulaire unique, mais que plusieurs mécanismes sont mis en jeu, dont l'endocytose clathrine dépendante et la macropinocytose. Les deux types d'EV sont capables de rétablir la fonction canal associée au CFTR dans les cellules CF15 de façon dose-dépendante, mais avec un effet de seuil minimum. L'activité CFTR reste stable pendant 3 jours, et à un niveau encore détectable après 5 jours. Notre travail démontre l'intérêt potentiel des MV et Exo comme vecteurs de biothérapie de pathologies génétiques.

Extracellular vesicles as bioactive macromolecules vectors : model of the ABCC7 transporter (CFTR) and application to the biotherapy of cystic fibrosis

SUMMARY

Cystic fibrosis is a genetic disease in which its prognosis depends on the lung damage. It is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR), resulting in a dysfunctional CFTR protein normally located at the plasma membrane of epithelial cells. This thesis is a study of a novel therapeutic approach to use extracellular vesicles (EVs), microvesicles and exosomes, as transfer vectors for CFTR mRNA and protein to target cells. The proof of concept for the transfer of CFTR mRNA and protein was first done in the CHO hamster model. To validate this concept on human cells, we used human bronchial Calu-3 cells, which express the endogenous CFTR protein, and A549 lung epithelial cells transduced by the adenoviral vector Ad5-GFP-CFTR to overexpress the fusion exogenous protein GFP-CFTR. We show that EVs produced by these cells could transfer a new functionality to CF15 target cells carrying the CFTRdeltaF508 mutation and the transfer seems to be more efficient in a homologous cell system versus a heterologous system. Interestingly, the exosomes seem to be more efficient in CFTR transfer than the microvesicles. A study of the mechanism of EVs cellular uptake show that it is temperature dependent and that endocytosis and macropinocytosis are implicated. Collectively, this study demonstrates the potential application of EVs for CFTR transfer and functional correction of the genetic defect in human CF cells.

DISCIPLINES : Sciences de la vie, biologie, santé

Mots clés : mucoviscidose, vésicules extracellulaires, microvésicules, exosomes, biothérapie
Key words: cystic fibrosis, extracellular vesicles, microvesicles, exosomes, biotherapy

UMR 754 UCBL Equipe Ronfort - 50, avenue Tony Garnier 69 366 Lyon cedex 07
UMR 5086 IBCP Equipe Di Pietro - 7, passage du Vercors 69 367 Lyon cedex 07